

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Desarrollo de un proceso tecnológico para el
mejoramiento de la digestibilidad de productos lácteos
por B-Galactosidasa inmovilizada**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

Juan Carlos WOOLCOTT HURTADO

Lima – Perú

1998

Con cariño y amor para
Sara y Esther, quienes
me apoyaron en mi
educación.

Para Carito con cariño y amor
por su comprensión a lo largo
de la realización de la tesis.

AGRADECIMIENTO

Mi sincero agradecimiento al Dr. Gerardo Gamarra Ballena, por haberme guiado y brindado sus amplios conocimientos y asesoramiento en la culminación de la presente tesis.

Al Blgo. Abad Flores Paucarima, por su apoyo, guía y revisión de la presente tesis, así como las facilidades brindadas en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Al Dr. Armando Yarlequé Chocas, por su apoyo y facilidades brindadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Al Dr. Andrés Illanés Fontaura y equipo, por las facilidades brindadas en el Laboratorio de Enzimas de la Facultad de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Católica de Valparaíso.

Mi sincero agradecimiento a los miembros del Jurado Examinador conformado por : Dr. Gerardo Gamarra, Dra. Dolores Bazalar, Dra. Luisa Negrón y Dr. Emilio Guija, por las sugerencias y correcciones finales para el buen logro de la presente tesis.

RESUMEN

Cinco cepas de levadura de *Kluyveromyces marxianus* y una cepa de *Candida psudotropicalis* fueron cultivadas en medio M-I, para la producción de β -galactosidasa (E.C 3.2.1.23). La cepa *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109 fue seleccionada por obtenerse mayor producción de la enzima y el máximo rendimiento de la enzima se obtuvo con 5% de lactosa suplementado con extracto de levadura 0.5%, $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$ 0.75% Y k_2HPO_4 0.45% (p/v), obteniéndose un rendimiento de 5.45 U/mg de proteína y 1.33 U.A_{ONPG}/mg de peso seco. La extracción de la enzima a partir de células viables se realizó con toluedo 2% (v/v), durante 15 horas de tratamiento, a 30°C, en solución buffer de fosfato 0.1 M, pH 7.0 ± 0.1 , suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- a) El rendimiento de inmovilización de la enzima sobre quitina tratada con glutaraldehído fue de 40.6%, siendo el pH óptimo de 6.6 ± 0.1 .
- b) Los valores de K_m y V_m para la enzima inmovilizada utilizando lactosa como substrato fueron 49.43 mM y 160.62 micromoles/min/g de soporte. El K_i para galactosa fue de 43.65 mM.
- c) La vida media a 40°C de la enzima inmovilizada fue de 176 min, manteniendo 99% de su actividad durante 3 meses a 4°C y reteniendo hasta el 63.8% de su actividad original aún después de ser usada 20 veces.

INDICE

	PAGINA
1.- INTRODUCCION	1
2.- GENERALIDADES	4
3.- MATERIALES Y METODOS	8
4.- RESULTADOS	21
5.- DISCUSION	52
6.- CONCLUSIONES	60
7.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	61
8.- ANEXOS	70

SUMMARY

Five strains of *Kluyveromyces marxianus* a one of *Candida pseudotropicalis* were cultured in M-I medium for production of β -galactosidase (E.C 3.2.1.23). The strain *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109 was selected for the best production of enzyme and the maximum yield of enzyme was obtained on 5% lactose supplemented with 0.5% yeast extract, 0.75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0.45% K_2HPO_4 (w/v). It obtained a yield of 5.45 U/mg of protein and 1.33 A.U_{ONPG}/mg of dry weight. The extraction of the enzyme from viable cells was performed by toluene 2% (v/v), during 15 hours of treatment, at 30°C, in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0 ± 0.1 supplemented with 1 mM magnesium sulfate and 0.1 mM manganese sulfate.

The obtained results were the following :

- a) The yield of immobilization of enzyme on chitin treated with glutaraldehyde was 40.6%, being the optimum pH of 6.6 ± 0.1 .
- b) The values of K_m and V_m for immobilized enzyme using lactose as substrate were 49.43 mM and 160.62 micromole/min/g of support respectivity. The K_i by galactose was 43.65 mM.
- c) The half-life of immobilized enzyme at 40°C, was 176 min. maintaining 99% of activity for 3 months at 4°C and retained 63.8% of original activity even after being used for 20 times.

I.- INTRODUCCION

La leche es uno de los alimentos más completos de la naturaleza por su contenido de proteínas, carbohidratos, sales y vitaminas, elementos que le hacen un alimento ideal para niños, adultos y animales mamíferos (Paige y col. 1972)⁽⁷⁴⁾.

Desde el punto de vista nutricional hay un gran interés en reducir el contenido de lactosa en la leche y productos lácteos debido a que una gran parte de la población no lo puede asimilar por su escasa capacidad enzimática de conversión de la lactosa, (Coughlin y Charles 1980)⁽¹⁶⁾.

La lecha contiene aproximadamente el 4.8% de lactosa. Este carbohidrato es poco soluble y con baja capacidad edulcorante. Estos inconvenientes han limitado su uso en alimentos como helados, confites y otros. Así como, también han limitado el uso del suero lácteo por su alto contenido de lactosa.

En la industria láctea se eliminan grandes cantidades de subproducto que contienen un alto contenido de lactosa, sales y proteínas, especialmente en la industria quesera que elimina un suero ácido rico en lactosa. Se han realizado numerosos ensayos para el tratamiento de este suero ácido como la leche. Se ha planteado diversas alternativas para la utilización de la lactosa del suero lácteo desproteinizado. Estos estudios han sido dirigidos principalmente a la producción de biomasa celular y etanol, (Castillo y Bales 1978, Maiorella y Castillo 1984)^(13, 61).

Una de las aplicaciones más promisorias para el tratamiento en la industria láctica es la aplicación de la tecnología enzimática para la reducción del contenido de lactosa en leche y subproductos lácticos. Esta acción es

realizada mediante una hidrólisis enzimática utilizando la β -D-galactosido-galactohidrolasa (E.C. 3.2.1.23), la cual transforma la lactosa en galactosa y glucosa teniendo este último más poder edulcorante que la lactosa. (Borglum y Sternberg 1972)⁽⁶⁾. Esta transformación enzimática mejora los problemas de insolubilidad y de baja dulzura del producto. Este tratamiento hace, a la leche un alimento más nutritivo y aprovechable, (Coughlin y Charles 1980, Gekas y López-Leiva 1985)^(16, 32).

La hidrólisis enzimática de la lactosa ha sido sugerido como un medio de mejorar la calidad nutricional de la leche (Paige y col. 1972)⁽⁷⁴⁾ y de incrementar la utilización del suero lácteo del queso, (Holsinger 1978, Mahoney y Whitaker 1978)^(42, 59).

La lactasa se encuentra en animales, vegetales y microorganismos. Estos últimos han sido considerados como fuentes potenciales de la enzima.

Las levaduras lactosa fermentativa, tales como *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* y *Candida pseudotropicalis* y los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, son las principales fuentes de enzima y las más usadas comúnmente para su preparación, (Wierzbicki y Kosikowski 1973a)⁽⁹²⁾.

De todos estos microorganismos solo la enzima de *Kluyveromyces fragilis*, tiene el pH apropiado para hidrólisis de lactosa en leche, (Mahoney y Whitaker 1977)⁽⁵⁸⁾.

Los factores que afectan la biosíntesis de la lactasa (Medio de cultivo, pH, temperatura, aereación, agitación) de *Kluyveromyces fragilis* han sido reportados por, (Davies 1956, Wendorff y col. 1969 -1971a, Mahoney y col. 1975-1977, Castillo y col. 1979, Sánchez y Castillo, 1980a, García-Garibay y

col. 1987, Antier y col. 1990)^(24 89, 90, 57, 58, 14, 78, 31, 1) y de *Kluyveromyces lactis* por (González Siso, 1994b)⁽³⁷⁾.

En la actualidad la hidrólisis enzimática es realizada con enzima soluble ; pero presenta el inconveniente de no poder ser recuperada. De ahí que la inmovilización de la enzima es una buena alternativa, presentando la ventaja de poder ser reutilizadas permitiendo abaratar los costos de producción y separación.

Los objetivos de la presente investigación fueron :

- Determinar las condiciones operativas óptimas para la producción y extracción de β -galactosidasa a partir de cinco cepas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109, 1207, 1151, 1175 y 1196 y una cepa de *Candida pseudotropicalis* NRRL-Y-329, en medios químicamente formulados.
- Establecer las bases para el diseño de un proceso tecnológico para inmovilizar la enzima.
- Determinar el perfil térmico, pH óptimo, constantes cinéticas y vida media.
- Determinar su capacidad de hidrolizar la lactosa presente en leche y suero lácteo.

II.- GENERALIDADES

Los estudios de purificación y caracterización de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* realizados por (Mahoney y Whitaker 1978) ⁽⁵⁹⁾. Muestran que el peso molecular determinado por ultracentrifugación y filtración en gel fue de 201.000 daltones. El examen de la proteína por microscopía electrónica sugiere que está constituida por 9 ó 10 subunidades en un arreglo de tipo pentagonal el cual confiere un número mayor de contactos por subunidades haciéndola más estable. La reacción con paramercuribenzoato (PCMB), indica que la enzima puede poseer 5 sitios activos por molécula, lo cual debería ser compatible con un modelo de 10 subunidades. Por otro lado, el análisis electroforético sugiere que la molécula presenta 2 subunidades grandes diferentes de 90,000 y 120,000 daltones. El punto isoelectrico de la mayor isoenzima es de 5.1. El coeficiente de extinción molar de la enzima determinado a 280 nm es de 1.58 cm² por miligramo de proteína y la relación de A_{280}/A_{260} es 1.60. La enzima carece de carbohidratos y presenta el 30% de aminoácidos hidrofóbicos en su composición.

El máximo rendimiento y la mayor actividad específica de la enzima se logra al comienzo de la fase estacionaria Dickson y Markin (1979)⁽²⁶⁾.

La optimización de la producción de β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* ha sido reportado por, (Moresi y col. 1979a, 1979b, 1980a, 1980b y 1989, e Inchaurredo y col. 1994)^(66, 67, 68, 69, 70, 52) y de *Kluyveromyces lactis* por (González Siso 1994a)⁽³⁷⁾.

El aislamiento y caracterización de β -galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus* ha sido reportado por (Dahlqvist y col. 1977, Mahoney y Whitaker 1977, Guy y Bingham, 1978, Baer y Loewenstein, 1979, Goncalves y Castillo, 1982, Brady y col. 1995)^(23, 58, 39, 2, 34, 7), y de *Kluyveromyces lactis* por

(Biermann y Glantz 1968, Dickson 1979-1980, Pivarnik y Rand, 1992 y Cavaille, 1995)^(5, 26, 27, 75, 15).

Métodos para la preparación de crudos de lactasa han sido descritos y reportados por muchos investigadores. Estos métodos incluyeron el tratamiento con solventes, como cloroformo, (Van Dam y col. 1950 y Bales y Castillo, 1979)^(86, 3), con tolueno, (Mahoney y Whitaker, 1975)⁽⁵⁷⁾, con digitonina (Joshi y col. 1989)⁽⁵⁴⁾, con tritón X-100, (Vlach y Prenosil, 1984)⁽⁸⁷⁾, con etanol, isopropanol, butanol, acetona y tolueno, (Fenton, 1982, Jaspers, 1975 y Champluvier, 1989)^(28, 53, 18), extracción tamponada de levaduras en polvo, (Sfortunato y Connors 1958, Chan, 1987, Wendorff y Amundson 1971b)^(81, 19, 91), con un método acuoso de dos fases con polietilen glicol y sales de fosfato, González y col. 1990)⁽³⁵⁾.

La inhibición de la lactasa de *Kluyveromyces fragilis* ha sido reportado por (Chen y col. 1985)⁽²⁰⁾, de *Aspergillus niger* por (Woychick y Wondolowski, 1972)⁽⁹⁴⁾, de *Escherichia coli* por (Kaul y col. 1985)⁽⁵⁵⁾.

Sistemas de inmovilización de β -galactosidasa de diversas fuentes han sido investigados para la hidrólisis de leche y productos lácteos. Estos incluyen: Adsorción física, enlace covalente, atrapadas en geles y microencapsulación.

La quitina ($C_8H_{13}NO_5$)_N, se encuentra en el exoexqueleto de crustáceos marinos, insectos y en las paredes celulares de algunos hongos. La quitina es una polímero de N-acetil glucosamina (2 acetamida -2- deoxi-D-glucosa) unidas por enlaces β (1-4). El polímero presenta 5 de cada 6 grupos aminos acetilados. Las proteínas están ligadas covalentemente al polímero. (Stanley y col. 1975)⁽⁸³⁾.

La quitina posee buenas propiedades mecánicas, elevada estabilidad química y biológica y una adecuada reactividad hacia agentes bifuncionales. (Illanés 1990a)⁽⁴⁶⁾.

La lactasa de *Kluyveromyces fragilis*, (sinónimo de *Kluyveromyces marxianus*) y *Aspergillus oryzae* han sido inmovilizada en quitina tratada con glutaraldehído por (Illanés y col. 1988, 1990a, 1990b, 1991, 1993, 1994a, 1994b)^(45, 46, 47, 48, 49, 50, 51). Lactasa de *Kluyveromyces marxianus* ha sido inmovilizada en quitosano (Carrara y Rubiolo, 1994-1996)^(10,11), en soporte magnético no poroso, (Halling y Dunnill, 1979)⁽⁴⁰⁾, en moyuelo de maíz, (González Siso y col. 1994a)⁽³⁶⁾.

La lactasa es muy estable en almacenamiento, Sharp (1969)⁽⁸²⁾, encontró actividad de enzima inmovilizada en DEAE celulosa después de 3 años.

Olson y Stanley (1973)⁽⁷³⁾ reportaron una columna operativa de lactasa sobre lactosa después de 6 semanas sin aparente pérdida de actividad, sin embargo cuando se usó en leche descremada reconstituida encontró un 10% de pérdida de actividad después de 17 horas de uso.

La actividad de la β -galactasidasa se ve influenciada por la presencia de iones en solución. El magnesio 0.001 M y el manganeso 0.0001 M, incrementan la velocidad de hidrólisis de lactosa en tampón fosfato de potasio a pH 7.0 ± 0.1 (Mahoney y Whitaker 1977)⁽⁵⁸⁾.

Algunos factores presentes en la leche descremada interfieren en la reacción catalítica (iones de Na^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), han sido reportados por (Davies 1964, Dahlqvist y col. 1973)^(24, 22) pero que la cisteína y la seroalbúmina fueron activadores. La histidina estabiliza lactasa de *Kluyveromyces marxianus*. (Surve y Mahoney, 1994)⁽⁸⁵⁾.

La velocidad de hidrólisis de lactosa fue mayor en soluciones de lactosa que en leche descremada o suero lácteo, (Mahoney y Adamchuck 1980 y Flores y col. 1995)^(80, 30) y que el suero lácteo fue mejor sustrato que la leche descremada, (Wendorff y col. 1970, Sánchez y Castillo, 1980b)^(89,79).

La actividad de la enzima es inhibida por las proteínas de alto y bajo peso molecular presentes en el suero, (Sfortunato y Connors, 1958, Wendorff y col. 1971b, Olson y Stanley, 1973, Glacin y col. 1974 y Dahlqvist y col. 1973-1977)^(81, 91, 73, 33, 22, 23).

En nuestro país, no se ha reportado estudios sobre la inmovilización y utilización de la enzima a escala de laboratorio, ni industrial; sin embargo, cabe mencionar que en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, viene desarrollándose desde 1992, un programa de selección de levaduras nativas con potencial de producción de Biomasa y β -galactosidasa, habiéndose derivado de ella un informe técnico-científico, elevado a la UNU/UNESCO, de aislamiento y selección de levaduras alimenticias para procesos de bioconversión de residuos lácteos. (Flores 1993)⁽²⁹⁾.

III.- MATERIALES Y METODOS

1.- MICROORGANISMOS Y MEDIO DE MANTENIMIENTO.-

Se utilizaron 6 cepas de levaduras alimenticias de grado GRAS (Generally Recognized as safe) de la FDA (Food and Drug Administration, USA), con capacidad de utilizar lactosa como fuente de carbono: 5 cepas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109, 1175, 1151, 1207, 1196 y una cepa de *Candida pseudotropicalis* NRRL-Y-329, procedentes de la Northern Regional Research Laboratory (NRRL), pertenecientes a la colección de levaduras del laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Las levaduras fueron mantenidas sobre Agar Y.P.L. de Mawson (1988)⁽⁶³⁾ con la siguiente composición: Lactosa 1% ; Peptona de Caseína 1% ; Extracto de levadura 0.3% y Agar 1.5% (SIGMA y MERCK), y conservados a 4°C, transferidos mensualmente y verificados en su pureza.

2.- SELECCION DE CEPAS DE LEVADURAS CON POTENCIAL DE PRODUCCION DE β -GALACTOSIDASA.

2.1. PREPARACION DE INOCULO.

Los inóculos se prepararon en matraces de 500 ml con 50 ml de caldo Y.P.L con la siguiente composición: Lactosa 2% ; Extracto de levadura 0.3% ; Peptona de caseína 1% ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5% ; K_2HPO_4 0.5% y MgSO_4 0.05%, a pH 5.5 e incubados a 30°C por 15 horas. Matraces de un litro con 90 ml de caldo Y.P.L fueron inóculados con 10% (v/v) del caldo Y.P.L e incubados a 30°C con agitación constante

(150 strokes/minuto). La pureza de los inóculos se verificó por microscopía.

2.2. PRODUCCION DE LA ENZIMA

La actividad hidrolítica de la lactasa de las levaduras fue determinada en medio M-I (García-Garibay, 1987)⁽³¹⁾; con la siguiente composición: Lactosa 5%; Extracto de levadura 0.75%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.84%; K_2HPO_4 0.45% y MgSO_4 0.05%. Matraces de un litro con 90 ml del medio M-I, a pH 5.5 fueron inoculados con 10% (v/v) del caldo Y.P.L. e incubados a 30°C por 12 horas con agitación constante (150 strokes/minuto).

3.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La actividad enzimática de las levaduras fue determinada espectrofotométricamente en un espectrofotómetro SPECTRONIC 20D MILTON ROY, utilizando como sustratos O-Nitrofenil β -D-galactopiranosido (ONPG) y Lactosa (Mahoney y col. 1975)⁽⁵⁷⁾.

3.1.- ACTIVIDAD ENZIMATICA CON ONPG COMO SUBSTRATO

Se preparó ONPG (SIGMA) a una concentración de 1.25 mM en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6 suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso (Apéndice F). La mezcla de reacción contenía 2 ml de ONPG y 0.1 ml de extracto enzimático (dilución apropiada), luego se incubó a 40°C durante 2 minutos, la reacción fue detenida con 0.9 ml de Na_2CO_3 0.5 M y se leyó a 420 nm comparándose los resultados con una curva estándar de O-nitrofenol (SIGMA), (Apéndice A). Para cada uno de los ensayos se incluyó un blanco para la medición espectrofotométrica, que se obtuvo

agregando la enzima después de adicionar la solución de carbonato de sodio.

La Unidad de β -galactosidasa en la presente investigación, es definida como la cantidad de enzima que libera un micromol de O-nitrofenol por minuto por miligramo de proteína.

3.2.- ACTIVIDAD ENZIMATICA CON LACTOSA COMO SUBSTRATO

Se preparó soluciones de lactosa de 20 y 200 g/l en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6 suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso para la enzima soluble e inmovilizada respectivamente. La mezcla de reacción contenía 2 ml de la solución de lactosa y 0.1 ml de la enzima soluble y cantidades de enzima inmovilizada entre 0.001 y 0.005 g, luego se incubó durante 2 minutos a 40°C, bajo agitación suave en el caso de la enzima inmovilizada, y la reacción fue detenida con 0.9 ml de carbonato de sodio 0.5 M.

La glucosa liberada fue determinada por el método de la glucosa oxidasa. (SIGMA) (Apéndice B). En el caso de la enzima inmovilizada se determinó por secado en la estufa MEMMERT S 30 de un día para otro a 60°C, la cantidad de enzima inmovilizada contactada con el substrato. Para cada uno de los ensayos se incluyó un blanco para la medición espectrofotométrica, que se obtuvo agregando la enzima después de adicionar el carbonato de sodio.

4.- EXTRACCION DE LA ENZIMA

En la extracción de la enzima se evaluaron las condiciones óptimas de concentración de tolueno, fuerza iónica, tiempo de extracción, pH y

temperatura.

4.1.- EVALUACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS

4.1.1.- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE TOLUENO

Se centrifugó un volumen de 2.5 ml de cultivo fresco a 10,000 r.p.m. por 20 minutos en una centrífuga refrigerada MIKRO RAPID a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de células, fue tratado con 1, 2 y 3% de tolueno (SIGMA) bajo agitación por 90 minutos, después de lo cual se adicionó el tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0 suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso y se llevaron a temperaturas de 22, 30 y 37°C por 15, 17 y 20 horas de extracción según (Manoney 1975 y Fenton 1982)^(57, 28).

4.1.2.- DETERMINACION DEL pH OPTIMO.

Se siguió el mismo procedimiento anterior y el pellet de células se trató con 2% de tolueno bajo agitación por 90 minutos después de lo cual se adicionó el tampón fosfato de potasio 0.1 M suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso a pH 6.0, 7.0 y 8.0 y se llevaron a temperaturas de 22, 30 y 37°C por 15, 17 y 20 horas.

4.1.3.- DETERMINACION DE LA FUERZA IONICA.

Se procedió según (4.1.1). A las muestras obtenidas tratadas con 2% de tolueno. Se le adicionó el tampón fosfato de potasio a concentraciones de 0.001, 0.1 y 1 M suplementado con 1 mM de

sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso a pH 6.6, 7.0 y 7.4 y temperaturas de 22, 30 y 37°C por 15 horas de extracción.

4.1.4.- DETERMINACION DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DE EXTRACCION.

En todas las determinaciones anteriores se evaluaron paralelamente la temperatura y el tiempo de extracción, las temperaturas fueron 22, 30 y 37°C y los tiempos de extracción de 15, 17 y 20 horas.

4.2.- PURIFICACION PARCIAL DE LA ENZIMA.

Se trabajó con 1.5 l de cultivo conteniendo 8.9 g/l, se centrifugó a 10,000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C. Se colectaron los pellets y se trató con 2% de tolueno (v/v) por 90 minutos bajo agitación y luego se adicionó el tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0 suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso y se mantuvo por 15 horas a 30°C. Luego se centrifugó a 10,000 rpm por 20 minutos a 4°C y se recolectó el sobrenadante. Se adicionó 300 ml de acetona a 4°C, descartándose el sobrenadante y colectando los pellets en viales mantenidos a 4°C.

5.- OPTIMIZACION Y ESTANDARIZACION DE LA PRODUCCION DE LA ENZIMA SOBRE MEDIO QUIMICAMENTE FORMULADO.

Para la optimización y estandarización de los medios químicamente formulados, se siguió el diseño factorial propuesto por Chen (1992)⁽²¹⁾, que permitió evaluar la influencia de la lactosa, extracto de levadura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y K_2HPO_4 , sobre la producción de lactasa de la cepa de *Kluyveromyces*

marxianus NRRL-Y-1109. Los parámetros de fermentación fueron: pH 5.5, temperatura 30°C, agitación 150 strokes/minuto. El volumen de ensayo fue de 100 ml en matraces de un litro.

El inóculo se preparó en un matraz de 500 ml con 50 ml de medio de cultivo el cual contenía lactosa 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.84%, extracto de levadura 0.75%, K_2HPO_4 0.45% y MgSO_4 0.05%. Los factores evaluados se distribuyeron en forma aleatoria, siguiendo el diseño factorial propuesto (Apéndice E). El diseño factorial aplicado comprende tres niveles siendo estos: concentración de lactosa: 25, 50 y 75 g/l ; concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 5.0, 7.5 y 10.0 g/l ; concentración de extracto de levadura: 2.5, 5.0 y 7.5 g/l ; concentración de K_2HPO_4 : 3.0, 4.5 y 6.0 g/l.

6.- INMOVILIZACION DE LA ENZIMA.

Para el proceso de inmovilización de la enzima se siguió el procedimiento de inmovilización diseñado por (Illanés y col. 1988-1991)^(45,48).

6.1.- PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACION.

Para la inmovilización se siguió el siguiente protocolo:
Se pesó 1 g de quitina (SIGMA) en un vaso de precipitado, se adicionó 50 ml de ácido acético 5% (v/v) y se dejó reposar 30 minutos a 50°C. Se enjuagó con agua destilada. La quitina lavada se colocó en un vaso de precipitado que contenía 8.4 ml de agua destilada, 0.5 ml de ácido acético (MERCK) y 1.6 ml de glutaraldehído al 25% (SIGMA), dejándose reposar por 16 horas a temperatura ambiente. Se eliminó el olor a ácido acético con agua destilada.

La quitina obtenida se colocó en un vaso de precipitado que contenía 8.95 ml de tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 8.5 y la

concentración de la enzima correspondiente en estudio. Se dejó reposar en refrigeración por 20 horas. Se lavó con tampón fosfato de potasio 0.1 M diluido 1/10, pH 6.6. Luego se lavó con NaCl 0.5 M, pH 7.0 preparado en tampón fosfato de potasio 0.1 M y se dejó almacenado en refrigeración en una solución 1 mM de ditioeritritol (SIGMA) preparado en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6 suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso hasta su uso.

6.2.- DETERMINACION DEL RENDIMIENTO DE INMOVILIZACION Y ACTIVIDAD ESPECIFICA.

Para la determinación del rendimiento de inmovilización y actividad específica se trabajó con 5 concentraciones de la enzima: 110, 220, 440, 660 y 880 Unidades por gramo de quitina según el procedimiento descrito en 6.1. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Se define el rendimiento de inmovilización como el porcentaje de la actividad original contactada que es expresada en el catalizador sólido.

$$RI = \frac{\text{Enzima inmovilizada}}{EI + ER + EP} \times 100$$

(EI= Enzima Inmovilizada, ER= Enzima Recuperada, EP= Enzima perdida).

Se define la capacidad de carga como la actividad específica cargada por unidad de peso seco de soporte.

$$CC = \frac{\text{Enzima inmovilizada}}{\text{Peso de soporte}}$$

Se realizaron en cada ensayo análisis de proteínas para determinar la proteína inmovilizada. La actividad se determinó según el procedimiento descrito en 3.2.

6.3.- DETERMINACION DE LA VELOCIDAD INICIAL DE LA ENZIMA SOLUBLE E INMOVILIZADA.

La determinación de la velocidad inicial, requiere que su velocidad sea constante en el tiempo. Esto se cumple cuando la enzima se encuentra saturada, trabajando para el caso con 20 y 200 g/l para la enzima soluble e inmovilizada.

Para la enzima soluble se trabajó con diluciones de 1:500, 1:1000, 1:1500 y 1:2000 y para la enzima inmovilizada se trabajó con cantidades entre 0.001 y 0.005 g. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado y la actividad enzimática se determinó sobre lactosa siguiendo el procedimiento descrito en 3.2.

7.- DETERMINACION DE LOS PARAMETROS FISICO-QUIMICOS OPTIMOS.

7.1.- PERFIL DE TEMPERATURA DE LA ENZIMA SOLUBLE E INMOVILIZADA.

Con la enzima soluble se trabajó a 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55°C y con la enzima inmovilizada a 25, 35, 45, 50, 55, 60 y 65°C. En todos los casos se utilizó lactosa como sustrato preparado en tampón fosfato de potasio 0.1 M, a pH 6.6, suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio

y 0.1 mM de sulfato de manganeso. Los ensayos se realizaron por duplicado a las temperaturas seleccionadas y la actividad enzimática se determinó según procedimiento descrito en 3.2. y calculándose la actividad relativa.

7.2.- PERFIL DE pH DE LA ENZIMA SOLUBLE E INMOVILIZADA.

Tanto con la enzima soluble e inmovilizada se trabajó a pH 5.8, 6.2, 6.6, 7.0, 7.5 y 8.0. La temperatura fue de 40°C y se usaron soluciones de lactosa como sustrato preparados en tampón fosfato de potasio 0.1 M suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso a los valores de pH seleccionados. Los ensayos se realizaron por duplicado y la actividad se determinó según el procedimiento descrito en 3.2. y calculándose la actividad relativa.

7.3.- TERMOESTABILIDAD DE LA ENZIMA SOLUBLE E INMOVILIZADA.

Con la enzima soluble se trabajó a 25, 30, 35, 40, 45, 50 y 55°C y con la enzima inmovilizada a 30, 40, 50, 60 y 70°C. Las muestras de las enzimas por duplicado fueron mantenidas por 15 minutos a las temperaturas escogidas en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6 suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso y luego colocadas en un baño de hielo. La actividad enzimática se determinó a 40°C según el procedimiento descrito en 3.2 y calculándose la actividad relativa.

8.- DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS.

8.1.- DETERMINACION DE K_m Y V_m PARA LA ENZIMA SOLUBLE E INMOVILIZADA.

Para estas experiencias realizadas por duplicado, se usaron 8 concentraciones de lactosa 5, 10, 15, 20, 25, 50 y 100 mM para la enzima soluble y 7 concentraciones de lactosa 14.606, 29.213, 43.82, 58.43, 87.64, 146.06 y 292.13 mM para la enzima inmovilizada preparados en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6, suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso.

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a 40°C según procedimiento descrito en 3.2. Se construyeron los gráficos de Lineweaver-Burk para determinar las constantes K_m y V_m .

8.2.- DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE INHIBICION (K_i) DE LA ENZIMA SOLUBLE E INMOVILIZADA.

Para la determinación de la constante de inhibición se usó galactosa como inhibidor.

Para la enzima soluble se utilizaron las mismas concentraciones utilizadas para la determinación de V_m y K_m adicionándole a cada concentración galactosa 27.7 mM.

Para la enzima inmovilizada se utilizaron 5 concentraciones de lactosa 14.6, 29.21, 58.43, 146.06 y 292.13 mM y 4 concentraciones de galactosa 75, 100, 150 y 200 mM. Todas las soluciones se prepararon en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6 suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso y se mezclaron ambas soluciones a fin de obtener las diferentes concentraciones de

lactosa pero a una sola concentración de galactosa. Los ensayos se realizaron por duplicado y la actividad enzimática se determinó según el procedimiento descrito en 3.2. Se construyeron los gráficos de Lineweaver-Burk respectivos para determinar el tipo de inhibición.

8.3.- ESTABILIDAD DE LA ENZIMA SOLUBLE E INMOVILIZADA.

Se usaron como parámetros la temperatura de 40°C para la enzima soluble y 25, 30 y 40°C para la enzima inmovilizada. Para los ensayos respectivos se mantuvo las muestras de enzima a las temperaturas escogidas en tampón fosfato de potasio 0.1 mM de sulfato de manganeso. En el caso de la enzima soluble por 4 horas y extrayendo muestras cada 15 minutos hasta la hora, cada 30 minutos hasta las 2 horas y cada hora hasta el final. En el caso de la enzima inmovilizada se extrajeron muestras a la 2, 4, 6 y 12 horas. La estabilidad de la enzima inmovilizada a 4°C en una solución de tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6, suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso y ditioeritritol 1mM como estabilizador fue determinada, tomándose muestras para los análisis respectivos a los 15, 30, 60 y 90 días. Las reacciones enzimáticas se realizaron por duplicado sobre lactosa como sustrato según el procedimiento descrito en 3.2 y calculándose la actividad relativa.

9.- DETERMINACION DE LA CAPACIDAD HIDROLITICA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE LACTOSA, LECHE ENTERA Y DESCREMADA Y SUERO LACTEO.

Se trabajó con leche entera en polvo reconstituida a una concentración de 130 g/l (130.26 mM de lactosa). La leche descremada se preparó de la leche reconstituida entera por centrifugación a 10,000 r.p.m. por 20 minutos a

4°C extrayéndose la grasa. El suero lácteo fue preparado a partir de la leche descremada por acidificación con HCl 0.1N y removida la caseína por centrifugación. La solución de lactosa se preparó a una concentración de 4.5% (131.08 mM) en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6 suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso. Las muestras de leche se ajustaron a pH 6.6 con KOH 0.1 N. Muestras de 25 ml de leche entera y descremada, suero lácteo y lactosa, por duplicado, fueron utilizadas para cada ensayo. Las reacciones enzimáticas se llevó a cabo a 40°C con cantidades de enzima entre 0.02 a 0.024 g, muestras de cada ensayo fueron extraídas a intervalos de 10 minutos para el análisis de la glucosa liberada, siguiendo el procedimiento descrito en 3.2.

10.- REUTILIZACION DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.

Se preparó leche entera en polvo (130 g/l), ajustándose su pH a 6.6 con KOH 0.1 N. La leche contenía 131.08 mM de lactosa. Se tomaron muestras de 25 ml. por duplicado. Los ensayos se llevaron a cabo a 40°C por una hora, con cantidades de enzima de 0.023 y 0.025 g, después del cual la enzima era recuperada y lavada en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6 suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso, bajo agitación por 15 minutos a fin de liberar los restos de leche que pudieran permanecer adheridos a la superficie del soporte y utilizándose en otro ensayo, sino era mantenida en refrigeración en el mismo tampón de lavado y ditioeritritol 1 mM. La actividad enzimática se determinó según el procedimiento descrito en 3.2.

11.- DETERMINACION DE PESO SECO.

La determinación del peso seco de las levaduras durante el proceso de fermentación fue determinado gravimétricamente para lo cual se extrajeron

muestras de cultivo de 5 ml las cuales fueron centrifugadas a 10,000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C y lavadas dos veces con agua destilada y transferidas a placas petri de 10X75 mm previamente pesadas, dejadas secar toda la noche en la estufa a 100°C MEMMERT S 30 y pesados en una balanza analítica SARTORIUS.

12.- DETERMINACION DE LACTOSA.

Se determinó de acuerdo al método de Miller (1959)⁽⁶⁵⁾ empleando el ácido 3,5 Dinitrosalicílico (SIGMA), el cual tiene una sensibilidad entre 5-500 ug de glucosa. (Apéndice C).

13.- DETERMINACION DE PROTEINAS.

La determinación del contenido proteico de los extractos obtenidos se realizó por el método de Lowry (1951)⁽⁵⁶⁾ empleando el reactivo Folin-Ciocalteu (SIGMA) y Seroalbúmina de bovino 0.1 mg/ml (SIGMA) como estándar. (Apéndice D).

IV.- RESULTADOS

4.1.- Selección de las cepas de levaduras con potencial de producción de β -galactosidasa.

De 5 cepas seleccionadas de *Kluyveromyces marxianus* y una cepa de *Candida pseudotropicalis* empleadas en la producción de β -galactosidasa en el medio M-I. Los resultados del análisis de varianza con una confiabilidad del 95% se muestran en la (tabla 1 y figs 1 7 2). Los valores de actividad específica (A.E) y de unidades de actividad/mg. de peso seco celular (U.A/mg) obtenidos sobre lactosa fueron respectivamente para *K. marxianus* NRRL-Y-1109 14.5 (A.E) y 3.5 (U.A/mg), *K. marxianus* NRRL-Y-1196 12.8 (A.E) y 3.2 (U.A/mg), *K. marxianus* NRRL-Y-1151 13.6 (A.E) y 2.92 (U.A/mg), *K. marxianus* NRRL-Y-1175 12.2 (A.E) y 2.5 (U.A/mg), *K. marxianus* NRRL-Y-1207 12.02 (A.E) y 3.1 (U.A/mg) y *Candida pseudotropicalis* NRRL-Y-329 11 (A.E) y 2.7 (U.A/mg). Los valores de actividad específica (A.E) y de unidades de actividad/mg. de peso seco celular (U.A/mg) obtenidos sobre ONPG fueron *K. marxianus* NRRL-Y-1109 5.43 (A.E) y 1.31 (U.A/mg), *K. marxianus* NRRL-Y-1196 4.8 (A.E) y 1.22 (U.A/mg), *K. marxianus* NRRL-Y-1151 5.07 (A.E) y 1.09 (U.A/mg), *K. marxianus* NRRL-Y-1175 4.53 (A.E) y 0.94 (U.A/mg), *K. marxianus* NRRL-Y-1207 4.44 (A.E) y 1.13 (U.A/mg), y *Candida pseudotropicalis* NRRL-Y-329 4.05 (A.E) y 0.99 (U.A/mg), observándose la mayor producción de β -galactosidasa en la cepa de *K. marxianus* NRRL-Y-1109.

4.2.- Extracción de la enzima.

Los resultados de los análisis de varianza con una confiabilidad del 99%, teniendo en consideración los diversos parámetros de extracción se reportan en las (tablas 1, 3, 4 y 5). Los resultados óptimos fueron obtenidos

cuando se empleó con 2% de tolueno, tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0, suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso, 30°C de temperatura y 15 horas de extracción.

4.3.- Purificación parcial de la enzima β -galactosidasa.

La purificación parcial de la enzima se realizó con acetona permitiendo obtener una enzima con una actividad específica de 72.9 U/mg de proteína usando lactosa como sustrato, con un rendimiento de purificación de 93%, los resultados se reportan en la tabla 6.

4.4.- Optimización y estandarización del medio de cultivo para la producción de β -galactosidasa.

El resultado de la respuesta factorial empleado en la optimización y estandarización del medio de cultivo para la producción de β -galactosidasa se reportan en la (tabla 7 y fig. 3). Los factores que más influyen en el modelo propuesto fueron: factor B ((NH₄)₂SO₄), factor C (extracto de levadura), factor D (K₂HPO₄) y la interacción de ellos.

Los mejores rendimientos en la producción de la enzima en relación a la actividad específica y unidades de actividad por miligramo de peso seco celular se obtuvieron con 50 g/l de lactosa.

4.5.- Determinación del rendimiento de inmovilización y actividad específica.

Los resultados del Rendimiento de Inmovilización y Actividad específica se muestran en las (fig. 4 y 5), observándose un rendimiento de 40.6% y una actividad específica de 178.59 U/g de soporte en un rango de 220 a 440

unidades de enzima por gramo de quitina. La proteína inmovilizada fue de 2,79 mg.

4.6.- Determinación de la velocidad inicial de la enzima soluble e inmovilizada.

Los resultados de la determinación de la velocidad inicial de la enzima soluble e inmovilizada se muestran en las (fig. 6 y 7). Para la enzima soluble se determinó la dilución de 1:2000 y para la enzima inmovilizada se determinó cantidades de soporte entre 0.001 y 0.005 g.

4.7.- Determinación de los parámetros Físico-químicos de la enzima soluble e inmovilizada.

Los resultados del perfil de temperatura para la enzima soluble e inmovilizada se muestran en la (fig. 8), observándose la máxima actividad específica de 66.69 U/mg. de proteína y 218.74 U/g. soporte a 40°C y 50°C para la enzima soluble e inmovilizada respectivamente.

Los resultados del perfil de pH para la enzima soluble e inmovilizada se muestran en la (fig. 9), observándose la máxima actividad específica de 67.77 U/mg. de proteína y 177.48 U/g. de soporte para la enzima soluble e inmovilizada respectivamente se obtuvieron a pH 6.6.

Los resultados de la termoestabilidad de la enzima soluble y de la enzima inmovilizada se muestran en la (fig. 10). La enzima inmovilizada mostró una actividad relativa de 93% a 40°C mientras que la enzima soluble sólo mostró un 88% de actividad relativa, a temperatura mayor de 40°C la estabilidad de ambas enzimas descendían gradualmente hasta un 3.26% de

actividad relativa a 55°C para la enzima soluble y a 3.3% de actividad relativa a 70°C para la enzima inmovilizada.

4.8.- Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima soluble e inmovilizada.

Los resultados se muestran en las (fig. 11 y 12). Los parámetros determinados fueron: K_m 15.13 y 49.43 mM y V_m 72.85 micromoles/min/mg de proteína y 160.62 micromoles/min/g. de soporte para la enzima soluble e inmovilizada. Los parámetros se determinaron a pH óptimo de 6.6 y temperatura de 40°C.

Los resultados de la determinación de la constante de inhibición se muestran en las (fig. 11, 13 y 13a). Reportando los valores hallados que fueron 14.64 y 43.65 mM para la enzima soluble e inmovilizada respectivamente.

4.9.- Estabilidad de la enzima soluble e inmovilizada.

Los resultados de la estabilidad de la enzima soluble se muestran en la (fig. 14). Se determinó una vida media de 56 minutos a 40°C. La estabilidad de la enzima inmovilizada (fig. 15), muestran una vida media de 176 minutos a 40°C, a 30°C una vida media de 7 horas ; mientras que a 25°C se mantenía estable por 122 horas.

La estabilidad de la enzima inmovilizada a 4°C (fig. 16), muestran que la enzima mantuvo su actividad por 90 días sin mayor pérdida de actividad.

4.10.- Capacidad hidrolítica de la enzima inmovilizada.

Los resultados de la hidrólisis de lactosa en las diferentes muestras analizadas (fig. 17), muestran que el 100% de hidrólisis se logró a los 70

minutos con lactosa en solución (4.5%), la leche descremada alcanzó un 97% de hidrólisis, el suero lácteo un 95% de hidrólisis y la leche entera un 94% de hidrólisis.

4.11.- Reutilización de la enzima inmovilizada.

Los resultados de la reutilización de la enzima inmovilizada (fig. 18), muestran que la hidrólisis de la lactosa en un 80% se mantuvo hasta el final del ensayo N° 13, descendiendo a 64% en el ensayo N° 20.

TABLA 1. SELECCION DE LAS CEPAS DE LEVADURAS PRODUCTORAS DE β -GALACTOSIDASA EN MEDIO M-I

Cepas	Actividad Enzimática sobre lactosa como sustrato				Actividad Enzimática sobre ONPG como sustrato			
	Proteína mg/ml	Unidades de Actividad/ ml	Actividad Específica U/mg proteína	Unidades de Actividad/ mg peso seco celular	Proteína mg/ml	Unidades de Actividad/ ml	Actividad Específica U/mg proteína	Unidades de Actividad/ mg peso seco celular
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL-1109	2.15	31.12	14.50	3.50	2.15	11.64	5.43	1.31
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL- 1151	1.91	25.99	13.58	2.92	1.91	9.70	5.07	1.09
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL- 1196	1.99	25.47	12.80	3.23	1.99	9.55	4.80	1.22
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL- 1175	1.91	23.35	12.20	2.53	1.91	8.66	4.53	0.94
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL- 1207	1.97	23.72	12.02	3.05	1.97	8.77	4.44	1.13
<i>Candida pseudotropicalis</i> NRRL- 329	1.84	20.25	11.00	2.68	1.84	7.46	4.05	0.99

TABLA 2. EVALUACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA LA EXTRACCION DE β -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109: CONCENTRACION DE TOLUENO, TEMPERATURA Y TIEMPO DE EXTRACCION EN TAMPON FOSFATO DE POTASIO 0.1M, pH 7.0.

Concentración de tolueno (%)	Temperatura (°C)	Tiempo de extracción (h)	Proteína mg/ml	Unidades de actividad _{ONPG} / ml	Actividad específica U/mg proteína	Unidades de actividad _{ONPG} / mg peso seco celular
1	22	15	2.56	9.19	3.56	0.80
2	22	15	3.12	12.94	4.15	1.13
3	22	15	3.28	9.47	2.89	0.83
1	30	15	2.72	10.72	3.95	0.93
2	30	15	3.44	15.35	4.45	1.34
3	30	15	3.60	11.58	3.22	1.01
1	37	15	2.80	9.52	3.41	0.83
2	37	15	3.36	13.88	4.13	1.21
3	37	15	3.76	10.47	2.79	0.91
1	22	17	2.80	8.82	3.15	0.77
2	22	17	3.28	12.53	3.83	1.09
3	22	17	3.60	9.37	3.52	0.82
1	30	17	2.96	10.70	3.62	0.93
2	30	17	3.44	14.92	4.34	1.30
3	30	17	3.76	11.54	3.07	1.01
1	37	17	3.04	9.53	3.14	0.83
2	37	17	3.44	13.58	3.95	1.18
3	37	17	3.76	10.45	2.78	0.91
1	22	20	2.96	8.76	2.96	0.76
2	22	20	3.28	12.47	3.81	1.09
3	22	20	3.44	9.41	2.74	0.82
1	30	20	3.04	10.36	3.41	0.90
2	30	20	3.52	14.68	4.17	1.28
3	30	20	3.76	11.47	3.05	1.00
1	37	20	2.96	9.37	3.17	0.82
2	37	20	3.44	13.11	3.81	1.14
3	37	20	3.84	10.23	2.67	0.89

TABLA 3. EVALUACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA LA EXTRACCION DE β -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109: pH, TEMPERATURA, TIEMPO DE EXTRACCION Y 2% DE TOLUENO.

pH	Temperatura (°C)	Tiempo de extracción (h)	Proteína (mg/ml)	Unidades de actividad _{ONPG} /ml	Actividad específica U/mg proteína	Unidades de actividad _{ONPG} /mg peso seco celular
6.0	22	15	2.84	8.97	3.17	0.78
7.0	22	15	3.26	13.89	4.27	1.21
8.0	22	15	3.68	11.59	3.17	1.01
6.0	22	17	2.94	8.97	3.17	0.78
7.0	22	17	3.36	13.59	4.05	1.18
8.0	22	17	3.36	11.05	3.24	0.96
6.0	22	20	2.94	8.82	3.00	0.77
7.0	22	20	3.15	13.14	4.19	1.14
8.0	22	20	3.36	10.89	3.24	0.95
6.0	30	15	2.84	12.27	4.33	1.07
7.0	30	15	3.26	15.82	4.87	1.38
8.0	30	15	3.89	12.06	3.11	1.05
6.0	30	17	2.94	11.80	4.02	1.03
7.0	30	17	3.05	14.76	4.85	1.29
8.0	30	17	3.26	11.92	3.67	1.04
6.0	30	20	3.05	11.51	3.79	1.01
7.0	30	20	3.26	14.02	4.32	1.22
8.0	30	20	3.26	10.59	3.27	0.92
6.0	37	15	3.26	12.09	3.72	1.07
7.0	37	15	3.68	14.82	4.04	1.30
8.0	37	15	3.78	11.44	3.03	1.00
6.0	37	17	3.26	11.58	3.56	1.01
7.0	37	17	3.36	14.06	4.20	1.23
8.0	37	17	3.47	9.51	2.75	0.83
6.0	37	20	3.05	11.59	3.81	1.01
7.0	37	20	3.26	12.97	3.99	1.13
8.0	37	20	3.47	10.05	2.90	0.88

TABLA 4. EVALUACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA LA EXTRACCION DE β -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109: FUERZA IONICA Y TEMPERATURA, CON 2% DE TOLUENO Y 15 HORAS DE TRATAMIENTO.

pH	Temperatura (°C)	Concentración tampón fosfato de potasio (M)	Proteína (mg/ml)	Unidades de actividad _{ONPG} /ml	Actividad específica U/mg proteína	Unidades de actividad _{ONPG} /mg peso seco celular
6.6	22	0.001	3.04	9.26	3.08	0.81
7.0	22	0.001	3.26	10.51	3.26	0.92
7.4	22	0.001	3.15	9.82	3.14	0.86
6.6	22	0.1	3.38	12.05	3.59	1.05
7.0	22	0.1	3.47	14.06	4.05	1.23
7.4	22	0.1	3.68	12.59	3.43	1.10
6.6	22	1	3.47	11.59	3.35	1.01
7.0	22	1	3.47	12.59	3.63	1.10
7.4	22	1	3.47	11.74	3.39	1.03
6.6	30	0.001	3.05	11.43	3.76	0.99
7.0	30	0.001	3.26	12.07	3.84	1.05
7.4	30	0.001	3.36	11.82	3.63	1.03
6.6	30	0.1	3.47	14.13	4.21	1.23
7.0	30	0.1	3.57	16.21	4.68	1.41
7.4	30	0.1	3.68	13.83	3.87	1.20
6.6	30	1	3.68	12.98	3.54	1.13
7.0	30	1	3.78	14.52	3.85	1.27
7.4	30	1	3.89	12.51	3.31	1.09
6.6	37	0.001	3.05	11.74	3.86	1.02
7.0	37	0.001	3.15	11.97	3.82	1.05
7.4	37	0.001	3.26	11.43	3.52	0.99
6.6	37	0.1	3.47	13.28	3.84	1.16
7.0	37	0.1	3.57	15.06	4.22	1.31
7.4	37	0.1	3.78	13.12	3.47	1.14
6.6	37	1	3.78	11.97	3.26	1.05
7.0	37	1	3.99	13.21	3.31	1.15
7.4	37	1	4.10	11.59	2.83	1.01

TABLA 5. CONDICIONES OPTIMAS PARA LA EXTRACCION DE β -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y- 1109

Factores	Promedio		Intervalo de confianza 99%	
	Actividad especifica U/mg proteína	Unidades de actividad _{ONPG} /mg peso seco celular	Actividad especifica U/mg proteína	Unidades de actividad _{ONPG} /mg peso seco celular
Concentración de tolueno (%)				
1	3.37	0.84	3.31 - 3.43	0.83 - 0.86
2	4.07	1.19	4.01 - 4.13	1.18 - 1.20
3	2.87	0.91	2.81 - 2.92	0.90 - 0.92
Tiempo de extracción (h)				
15	3.62	1.00	3.56 - 3.68	0.99 - 1.01
17	3.39	0.98	3.33 - 3.45	0.97 - 0.99
20	3.31	0.97	3.25 - 3.37	0.96 - 0.98
Temperatura (°C)				
22	3.43	1.00	3.32 - 3.55	0.99 - 1.03
30	3.85	1.16	3.73 - 3.97	1.13 - 1.18
37	3.57	1.10	3.45 - 3.69	1.07 - 1.12
pH				
6.6	3.61	1.05	3.48 - 3.72	1.03 - 1.07
7.0	3.85	1.16	3.73 - 3.97	1.14 - 1.19
7.4	3.40	1.05	3.28 - 3.51	1.03 - 1.07
Tampón fosfato de potasio (M)				
0.001	3.54	0.97	3.42 - 3.66	0.94 - 0.99
0.1	3.93	1.20	3.81 - 4.05	1.18 - 1.23
1	3.38	1.09	3.26 - 3.50	1.07 - 1.12

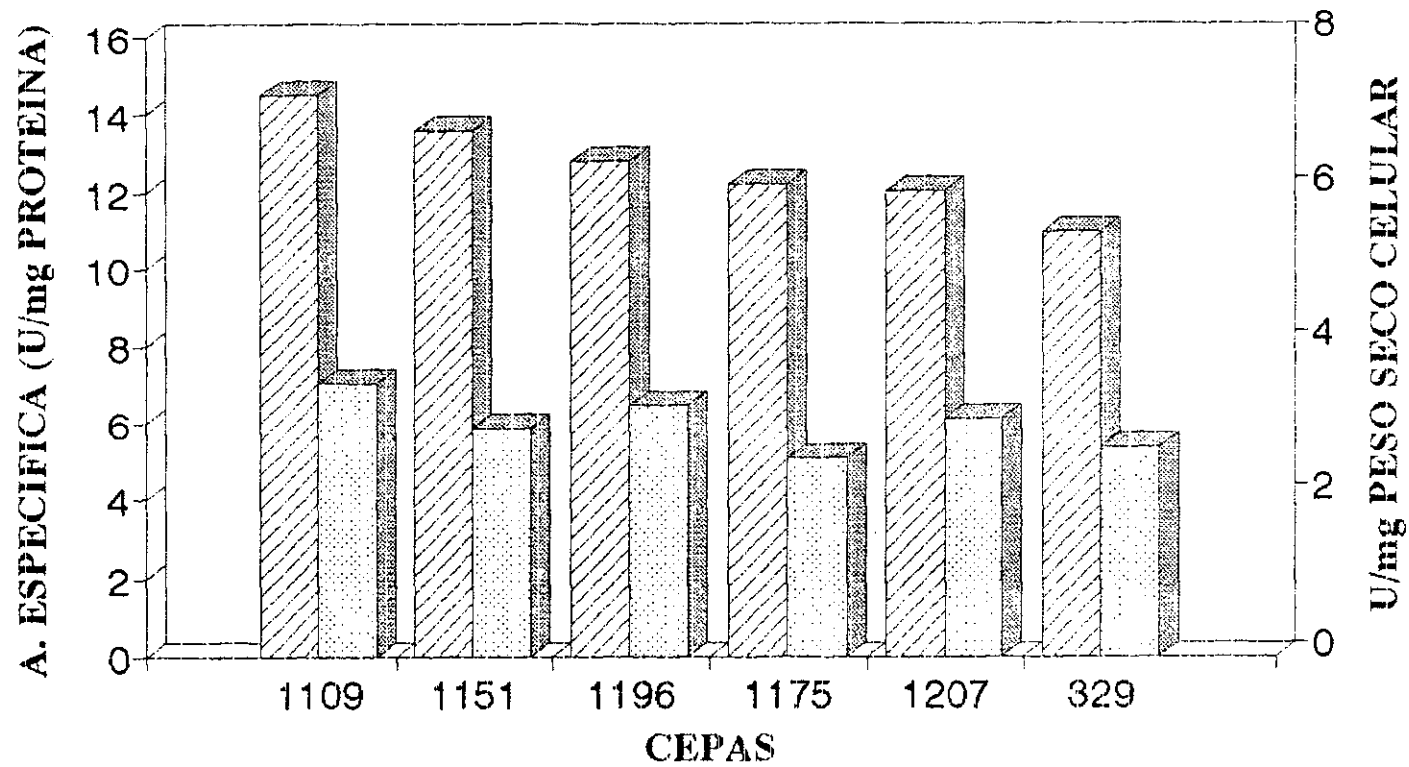
TABLA 6. PURIFICACION PARCIAL DE LA ENZIMA

Procedencia	Volumen (ml)	Actividad U/ml	Proteína (mg/ml)	A.Específica U/mg proteína	Unidades totales	Rendimiento (%)
Extracto crudo	300	155.63	5.36	29.02	46,689	100
Precipitación con acetona	10	4330	59.4	72.90	43,300	93

TABLA 7. RESPUESTA FACTORIAL DE LA OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO QUIMICAMENTE FORMULADO PARA LA PRODUCCION DE β -GALACTOSIDASA EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Nº de Experimento	Factores				Concentración celular (g/l)	Rendimiento $Y_{x/s}$	Proteína (mg/ml)	Respuesta Actividad Especifica U/mg proteína	Respuesta Unidades de Actividad _{ONPG} /mg peso seco celular	Unidades de Actividad ONPG/l
	Lactosa g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄ g/l	E. levadura g/l	K ₂ HPO ₄ g/l						
1	25	5.0	2.5	3.0	8.06	0.306	2.07	4.08	1.045	8,423
2	50	5.0	2.5	4.5	8.17	0.160	2.10	4.08	1.045	8,538
3	25	7.5	5.0	4.5	8.53	0.322	2.00	4.59	1.070	9,127
4	50	7.5	2.5	3.0	8.09	0.158	2.00	5.28	1.300	10,517
5	25	5.0	5.0	4.5	7.71	0.289	2.18	4.50	1.275	9,830
6	50	7.5	5.0	3.0	8.35	0.158	2.51	4.37	1.310	10,939
7	25	5.0	2.5	4.5	7.90	0.297	2.22	4.67	1.320	10,428
8	50	7.5	5.0	4.5	8.92	0.170	2.17	5.45	1.330	11,864
9	75	7.5	5.0	4.5	7.97	0.101	2.10	4.48	1.175	9,365
10	50	10.0	7.5	6.0	8.32	0.156	2.25	4.56	1.320	10,982
11	75	10.0	5.0	4.5	8.28	0.104	2.11	4.97	1.265	10,474
12	50	7.5	7.5	6.0	8.88	0.168	2.14	5.27	1.265	11,233
13	75	10.0	7.5	4.5	8.35	0.104	2.12	5.25	1.330	11,106
14	50	7.5	5.0	6.0	8.24	0.155	2.52	4.34	1.310	10,794
15	75	10.0	7.5	6.0	8.24	0.104	2,27	4.42	1.220	10,053

**FIG. 1 ACTIVIDAD ENZIMATICA
EN LACTOSA COMO SUBSTRATO**



Kluyveromyces marxianus 1109, 1151, 1196, 1175, 1207, *Candida pseudotropicalis* 329



A. ESPECIFICA



U/mg P.SECO CELULAR

**FIG. 2 ACTIVIDAD ENZIMATICA
EN ONPG COMO SUBSTRATO**

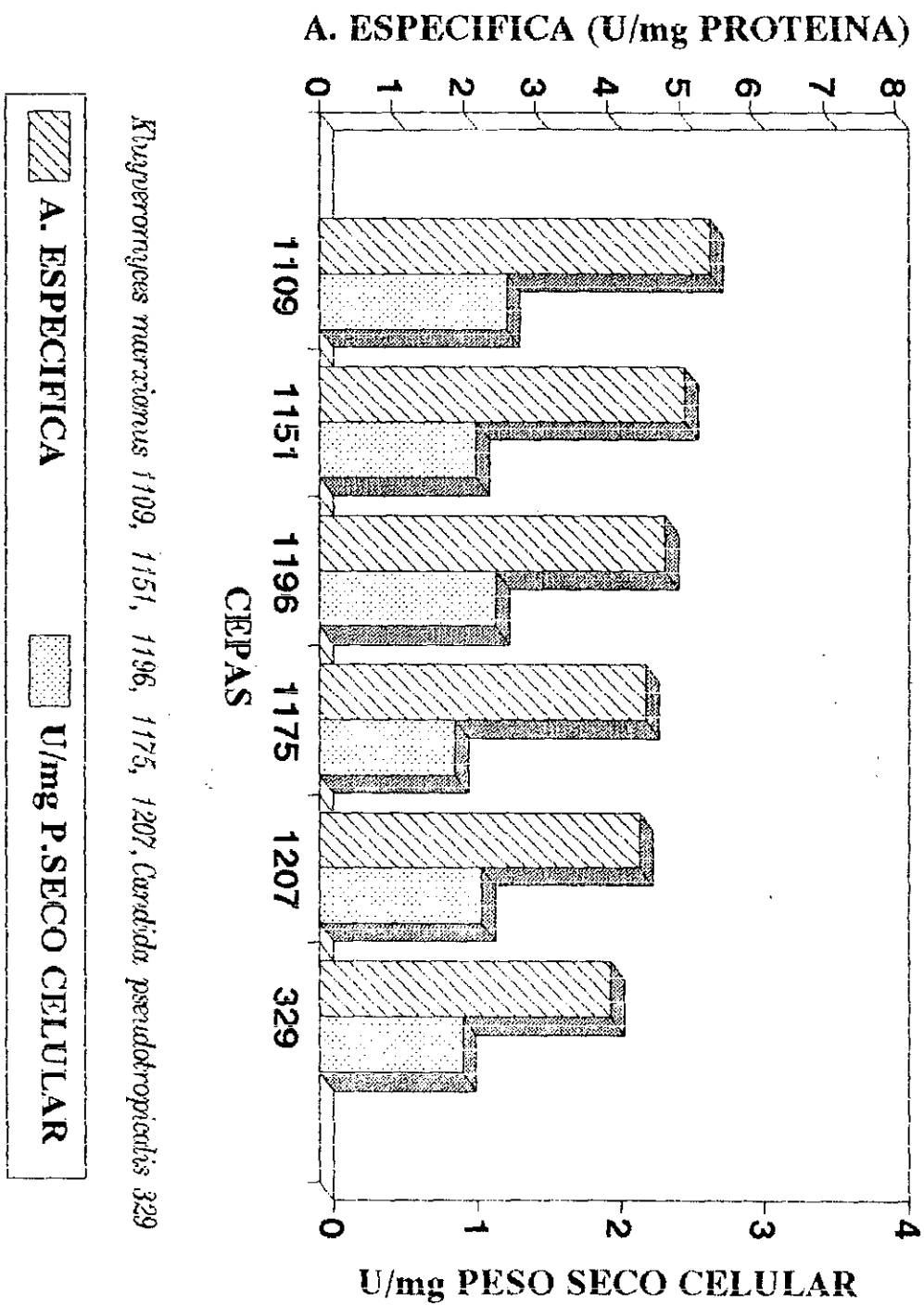
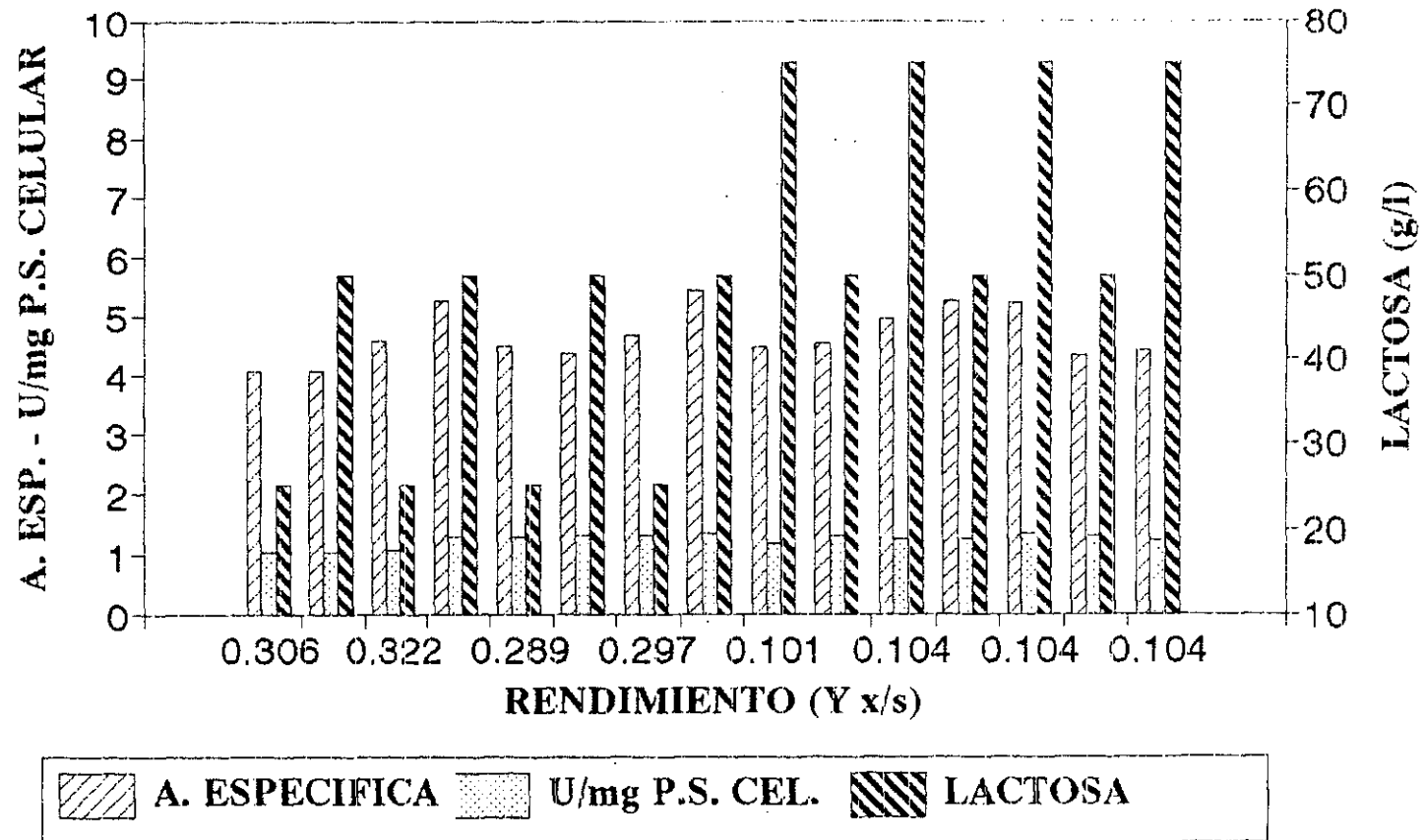


FIG. 3 OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA B-GALACTOSIDASA



**FIG. 4 RENDIMIENTO DE INMOVILIZACION
Y ACTIVIDAD ESPECIFICA**

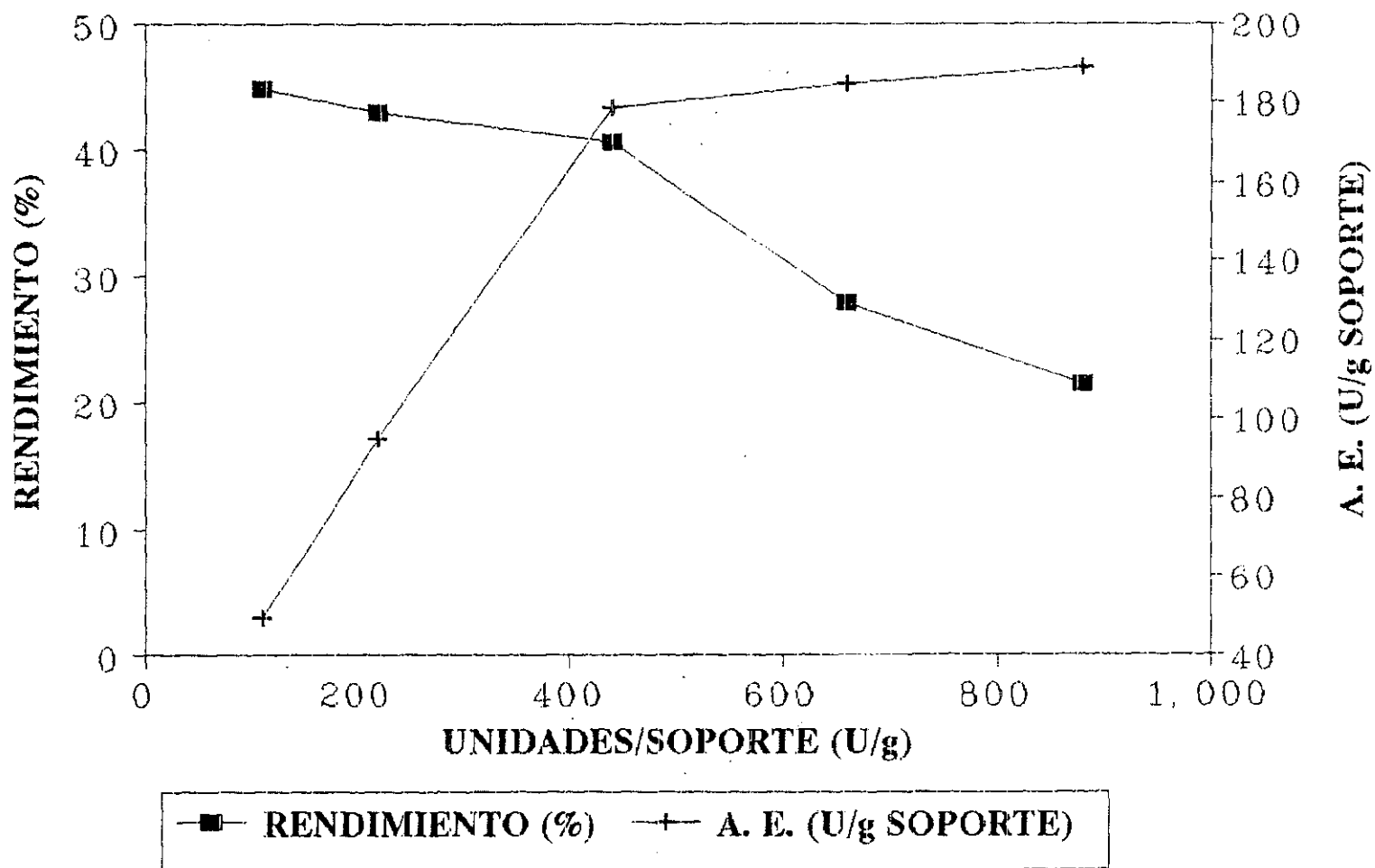


FIG. 5 PROTEINA INMOVILIZADA

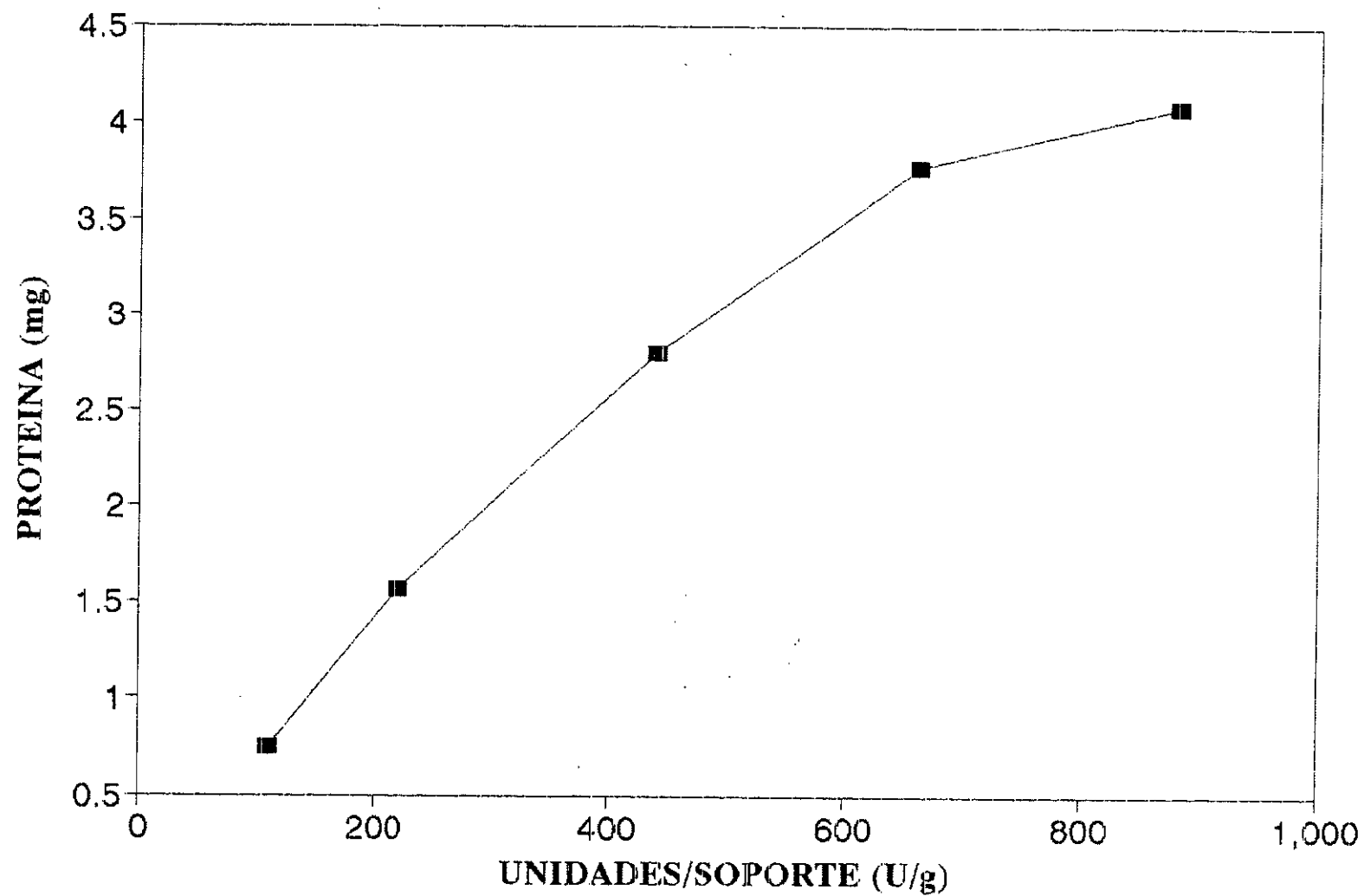
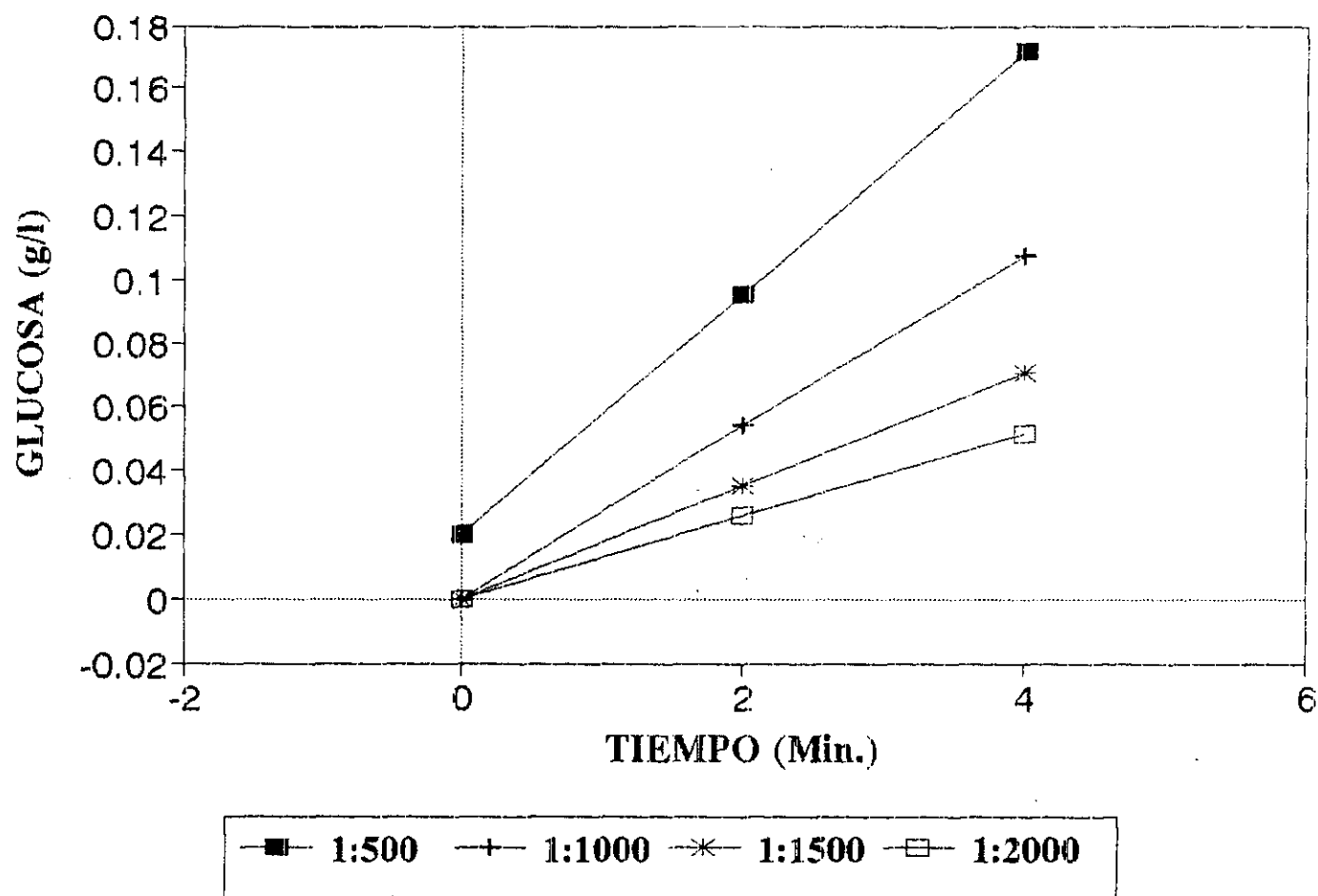


FIG. 6 VELOCIDAD INICIAL ENZIMA SOLUBLE



**FIG. 7 VELOCIDAD INICIAL ENZIMA
INMOVILIZADA**

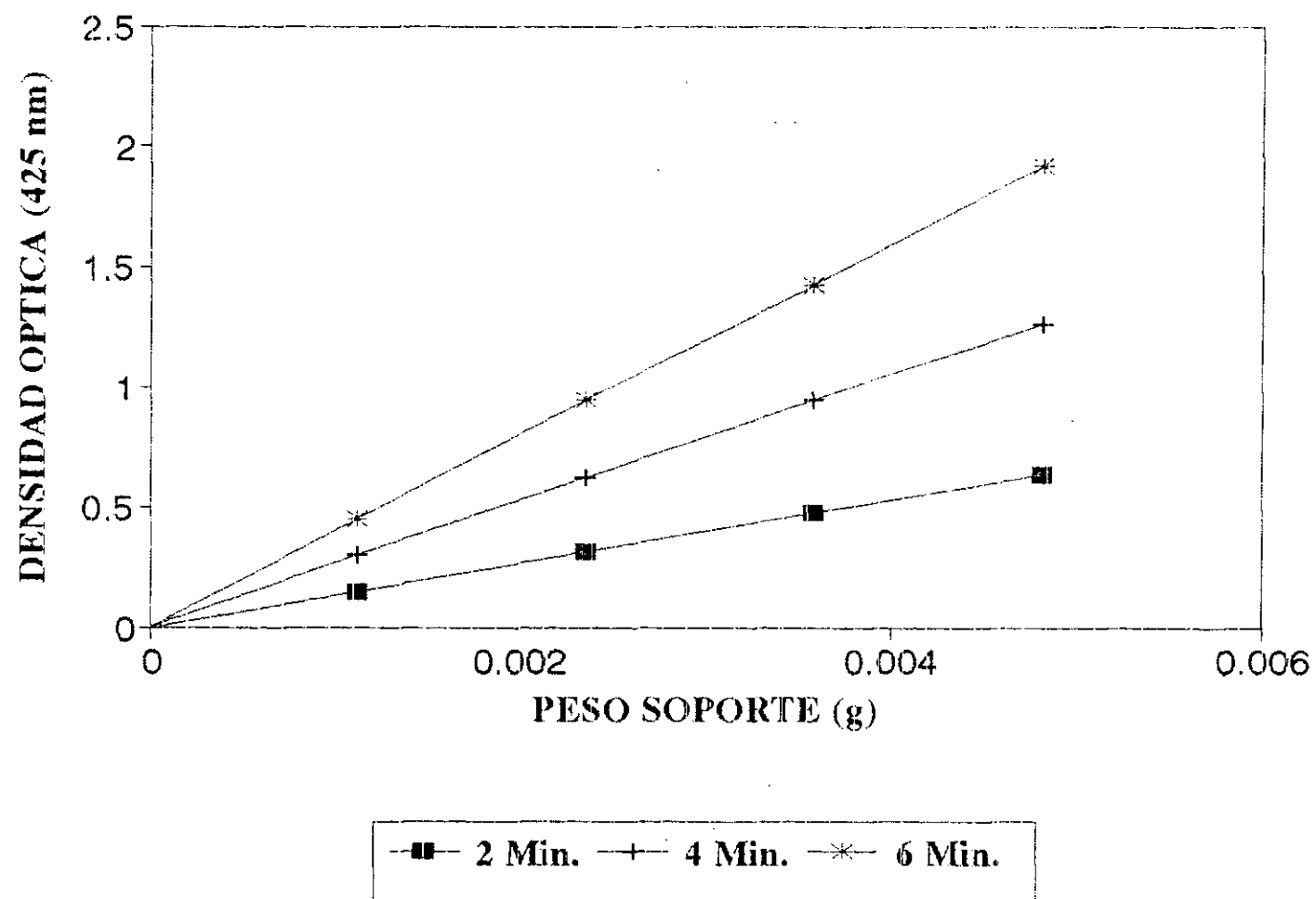
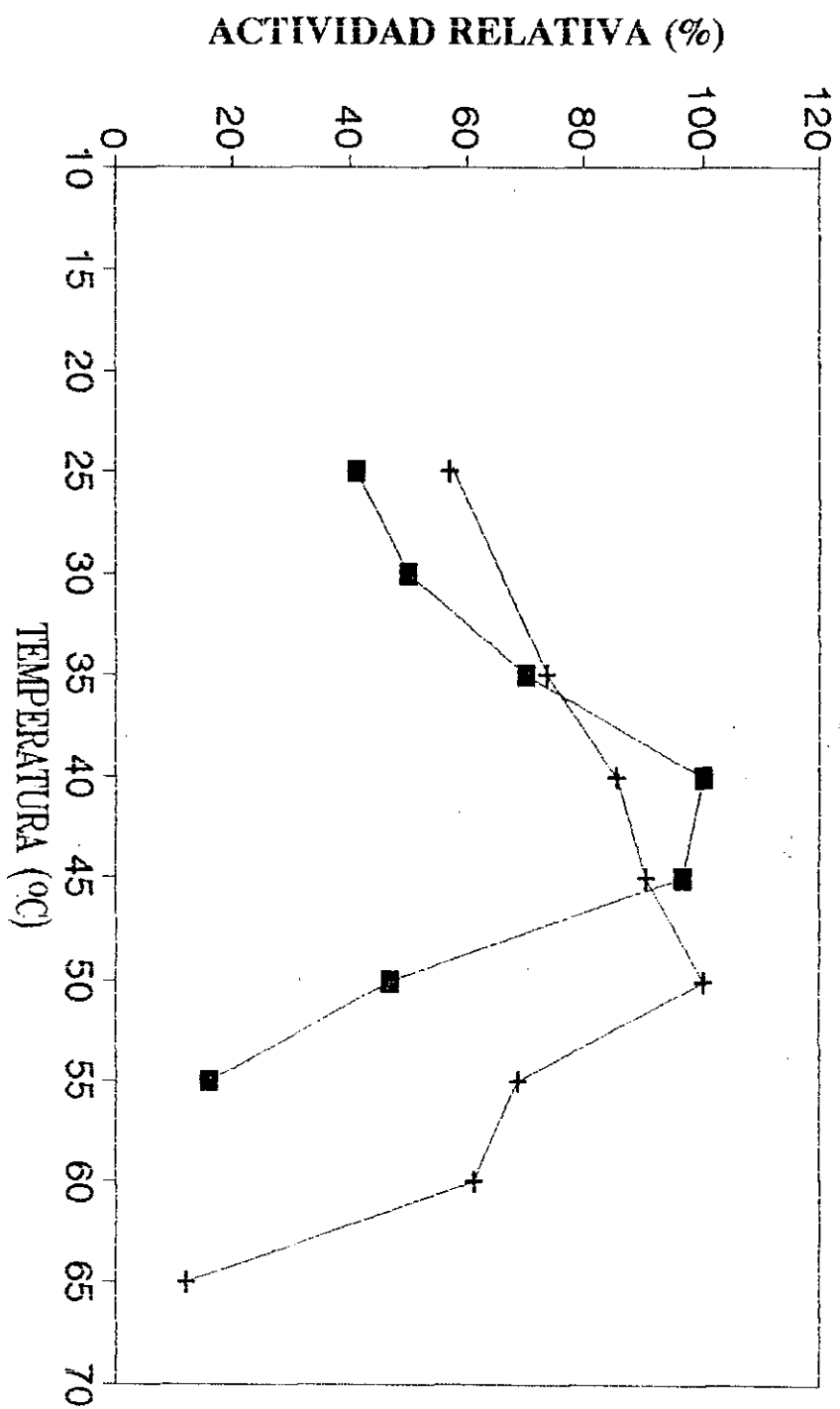
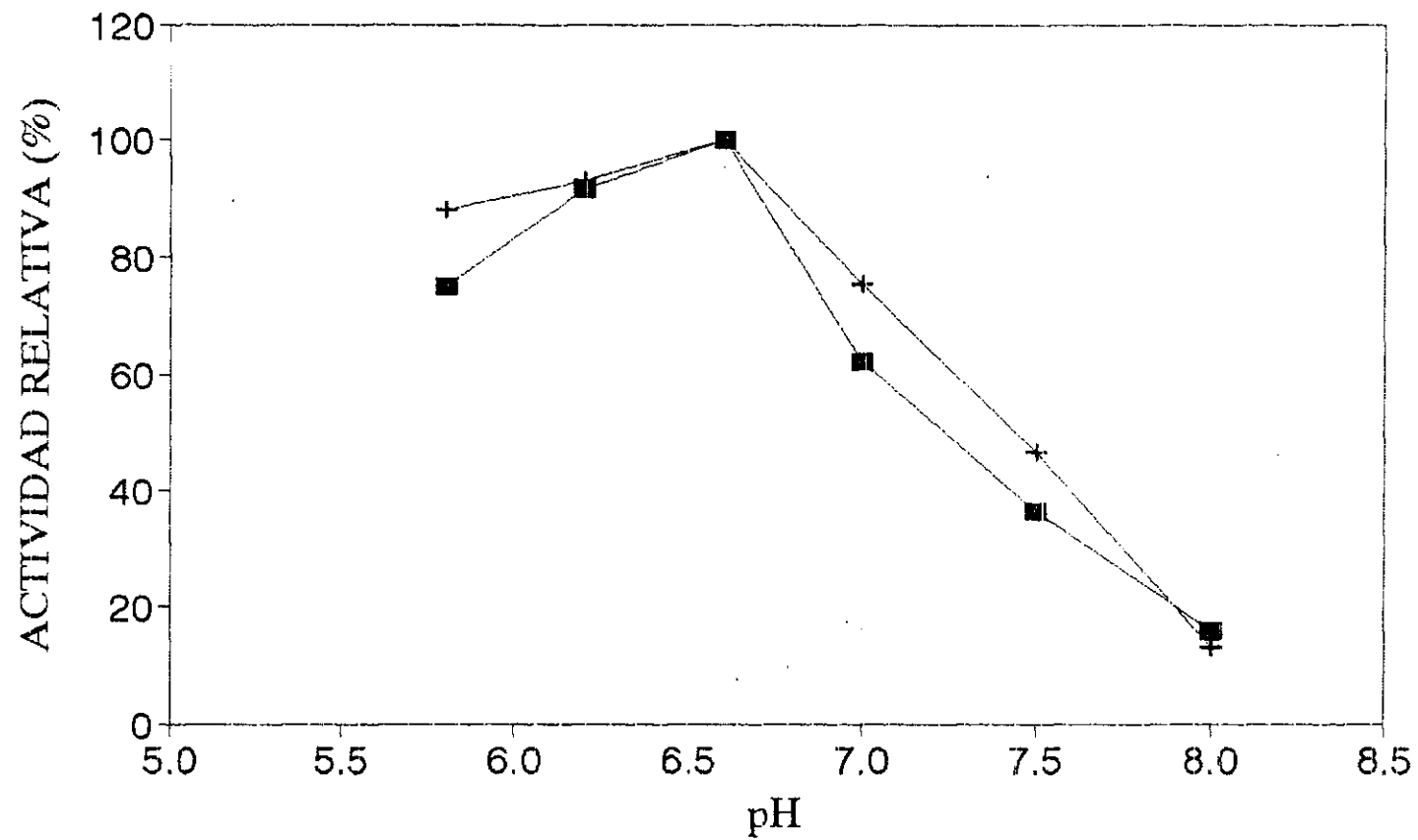


FIG. 8 PERFIL DE TEMPERATURA



■ ENZIMA SOLUBLE + ENZIMA INMOVILIZADA

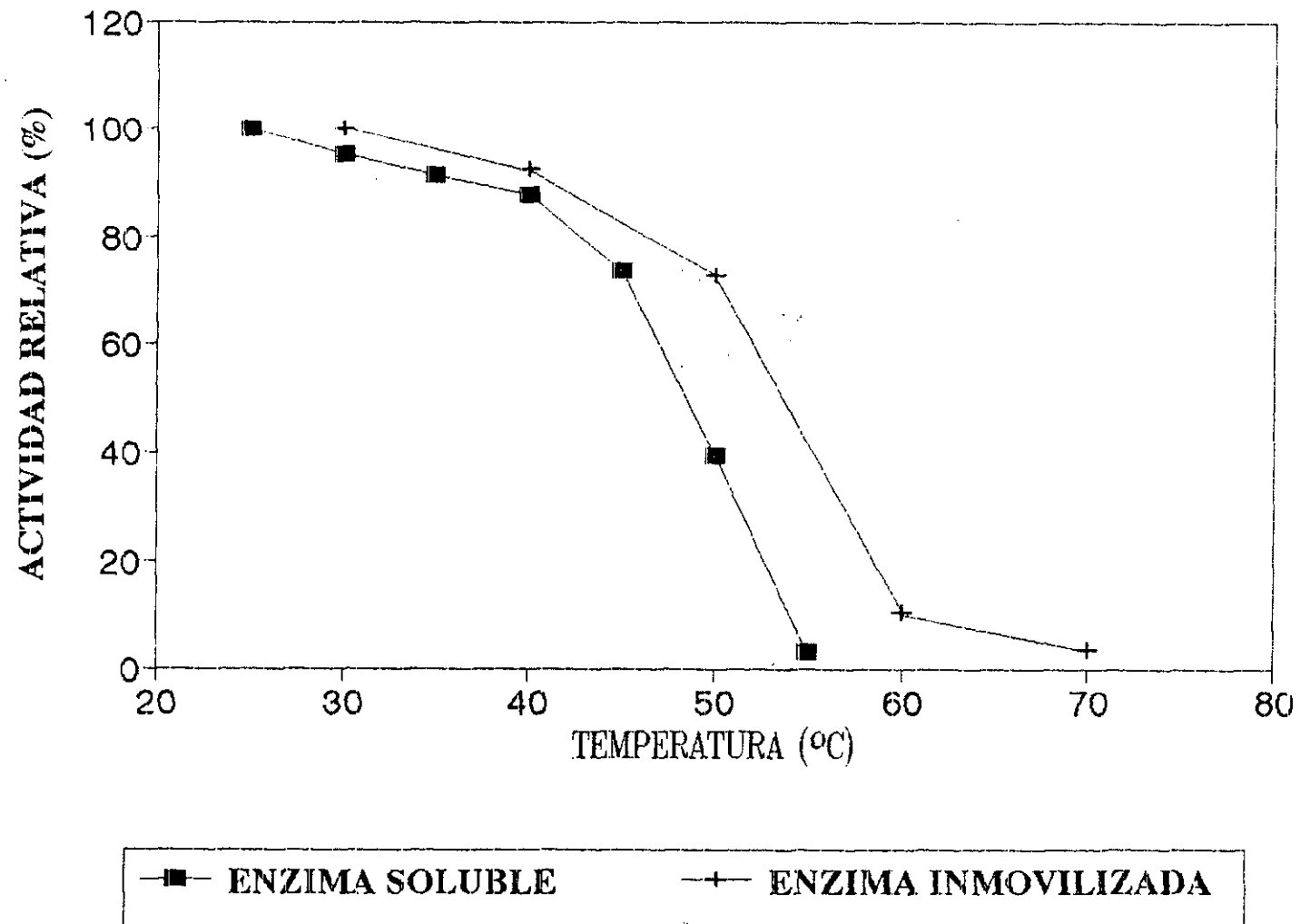
FIG. 9 PERFIL DE pH



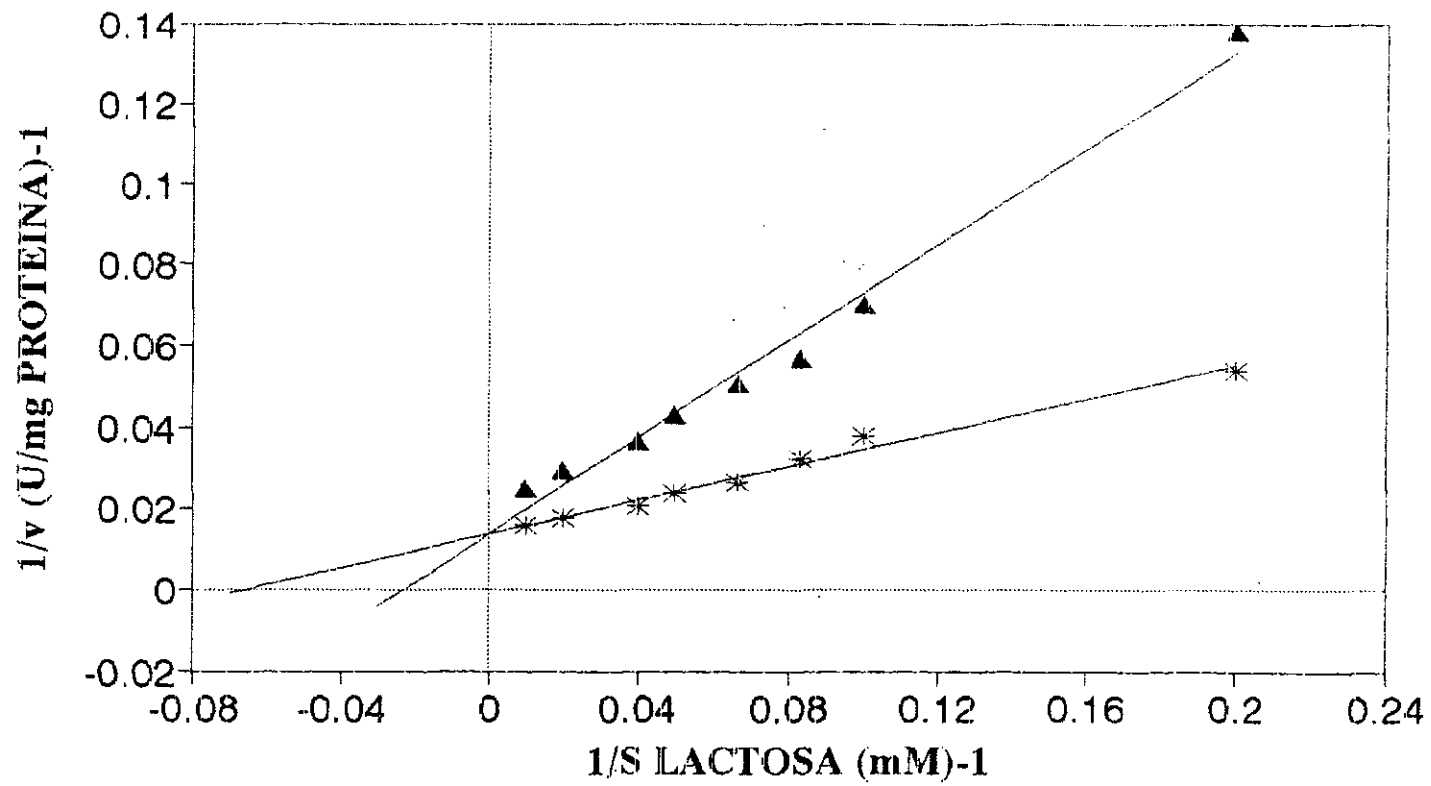
■ ENZIMA SOLUBLE

+ ENZIMA INMOVILIZADA

FIG. 10 TERMOESTABILIDAD

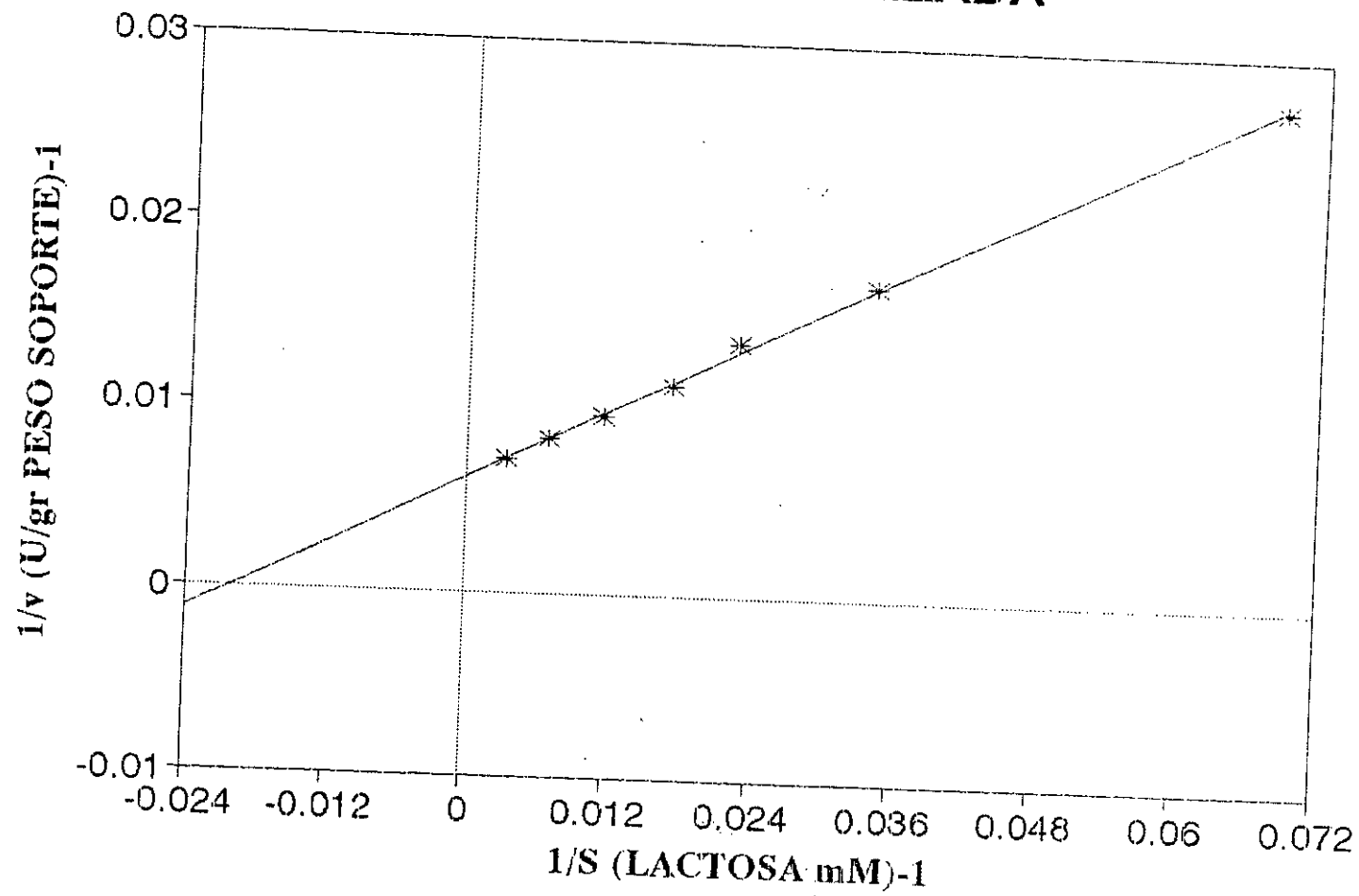


**FIG. 11 CONSTANTES CINETICAS K_m , V_m , K_i
ENZIMA SOLUBLE**

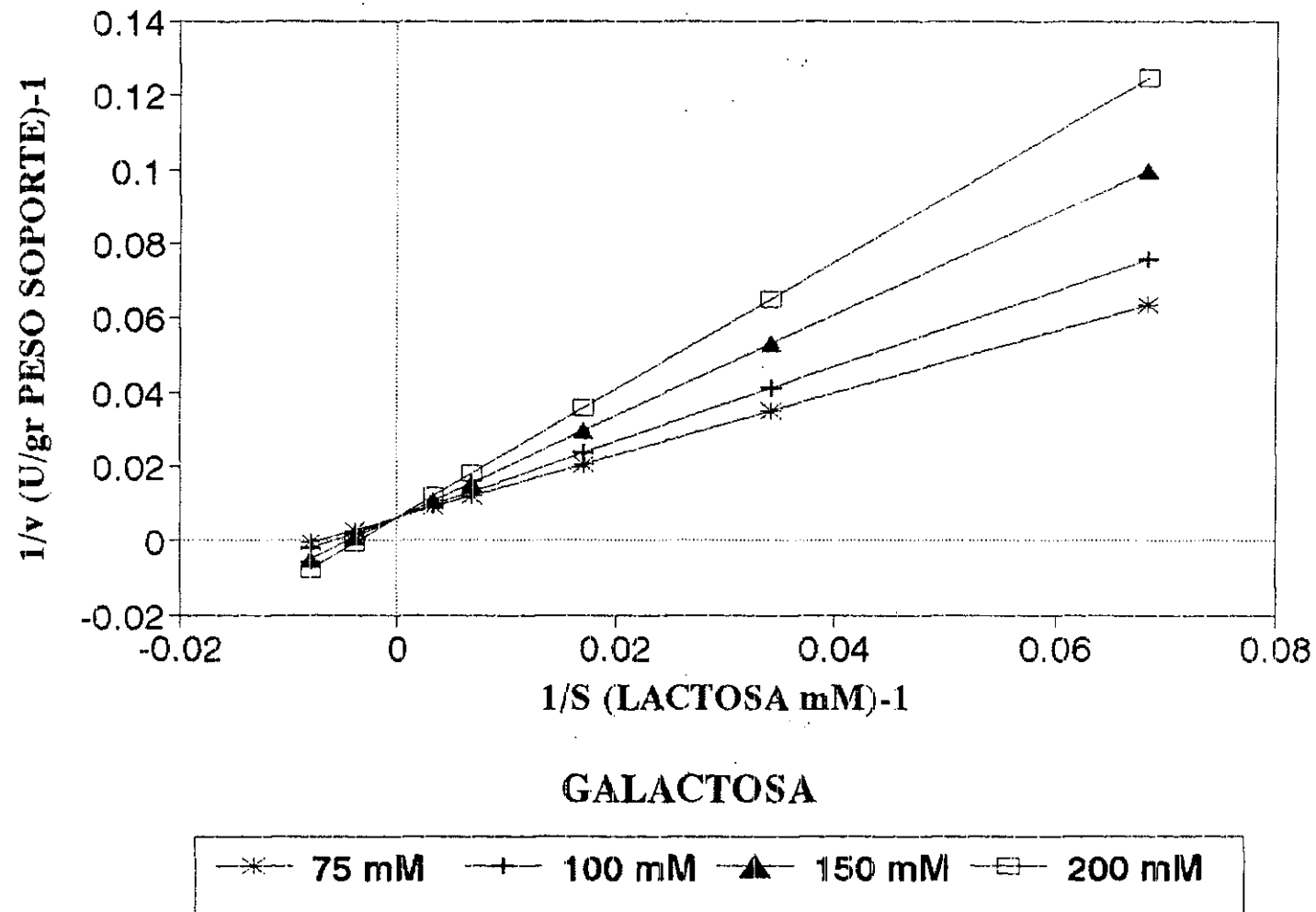


* SIN INHIBIDOR ▲ CON INHIBIDOR

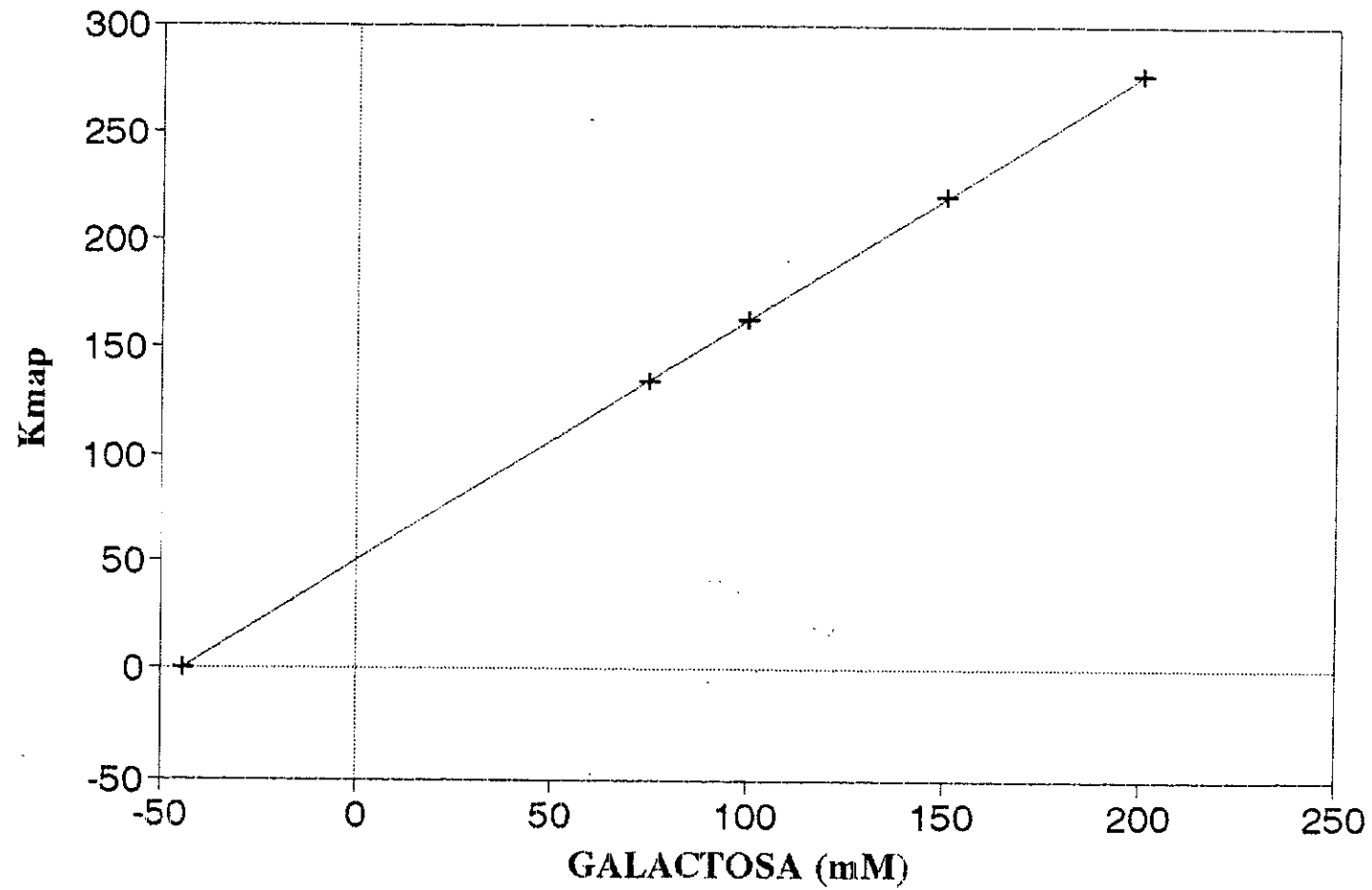
**FIG. 12 CONSTANTES CINETICAS K_m , V_m
ENZIMA INMOVILIZADA**



**FIG. 13 CONSTANTE DE INHIBICION K_i
ENZIMA INMOVILIZADA**



**FIG. 13 a CONSTANTE DE INHIBICION
ENZIMA INMOVILIZADA**



**FIG. 14 ESTABILIDAD ENZIMA
SOLUBLE**

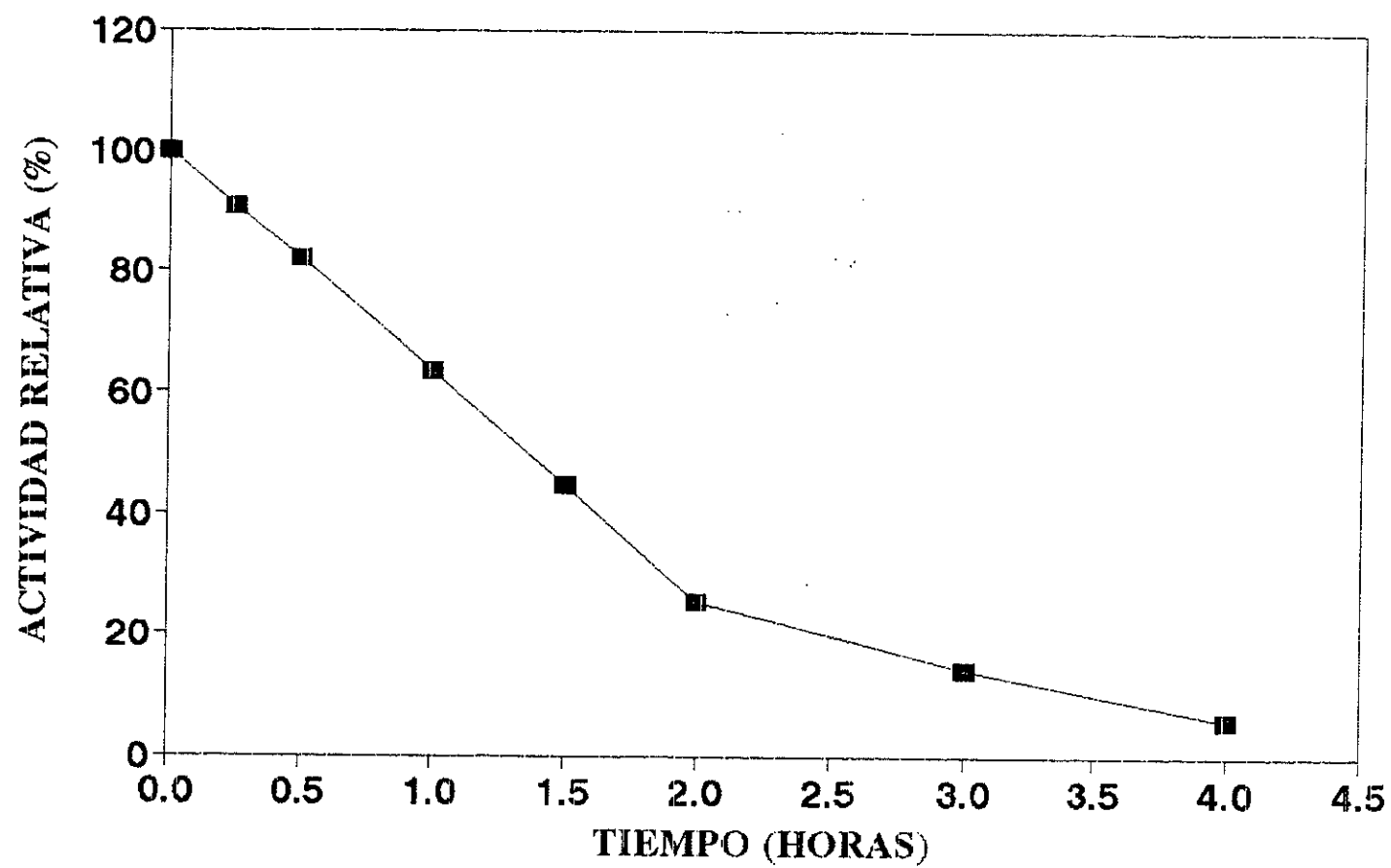
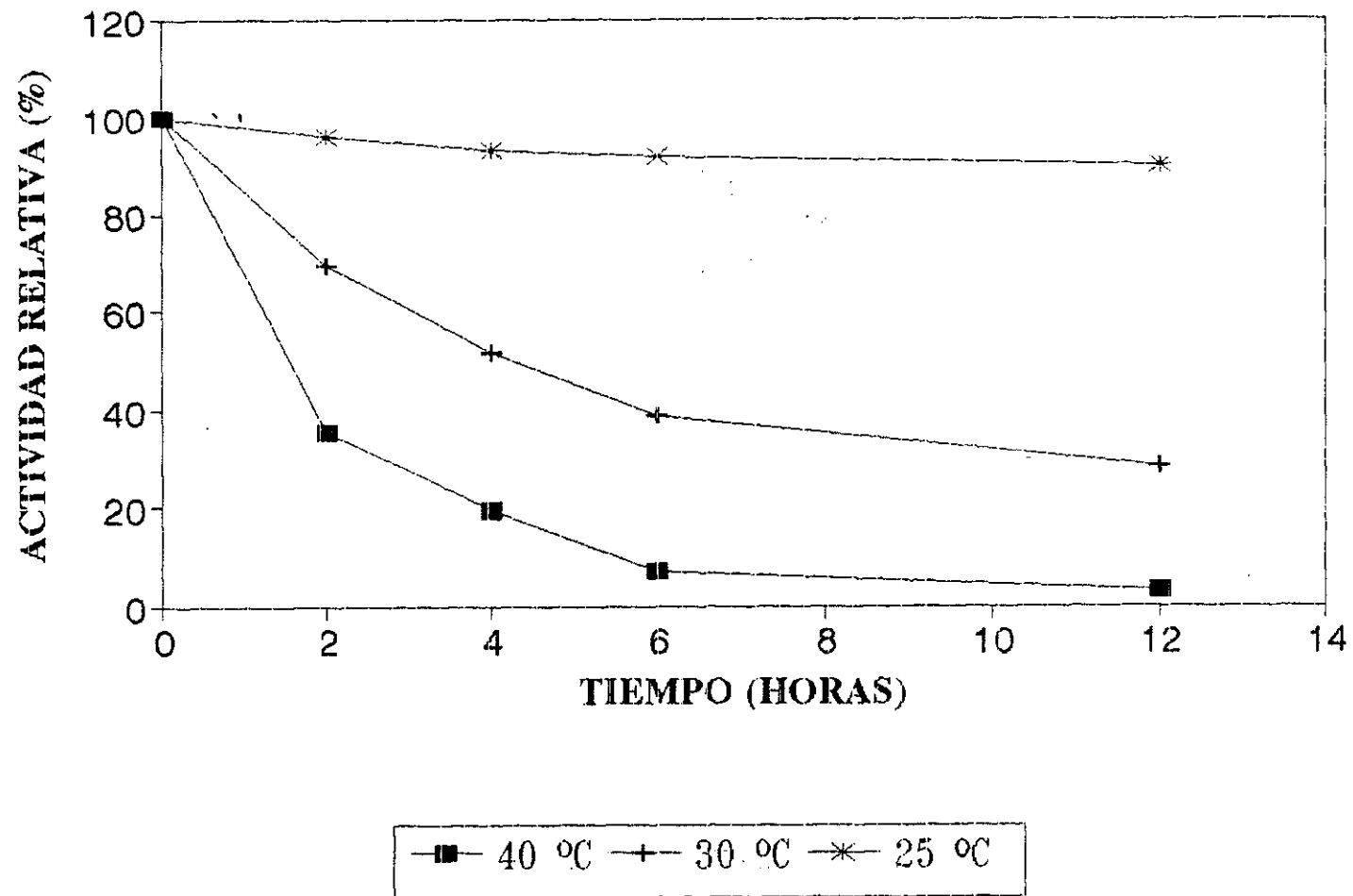


FIG. 15 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA



**FIG. 16 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA
INMOVILIZADA A 4 °C**

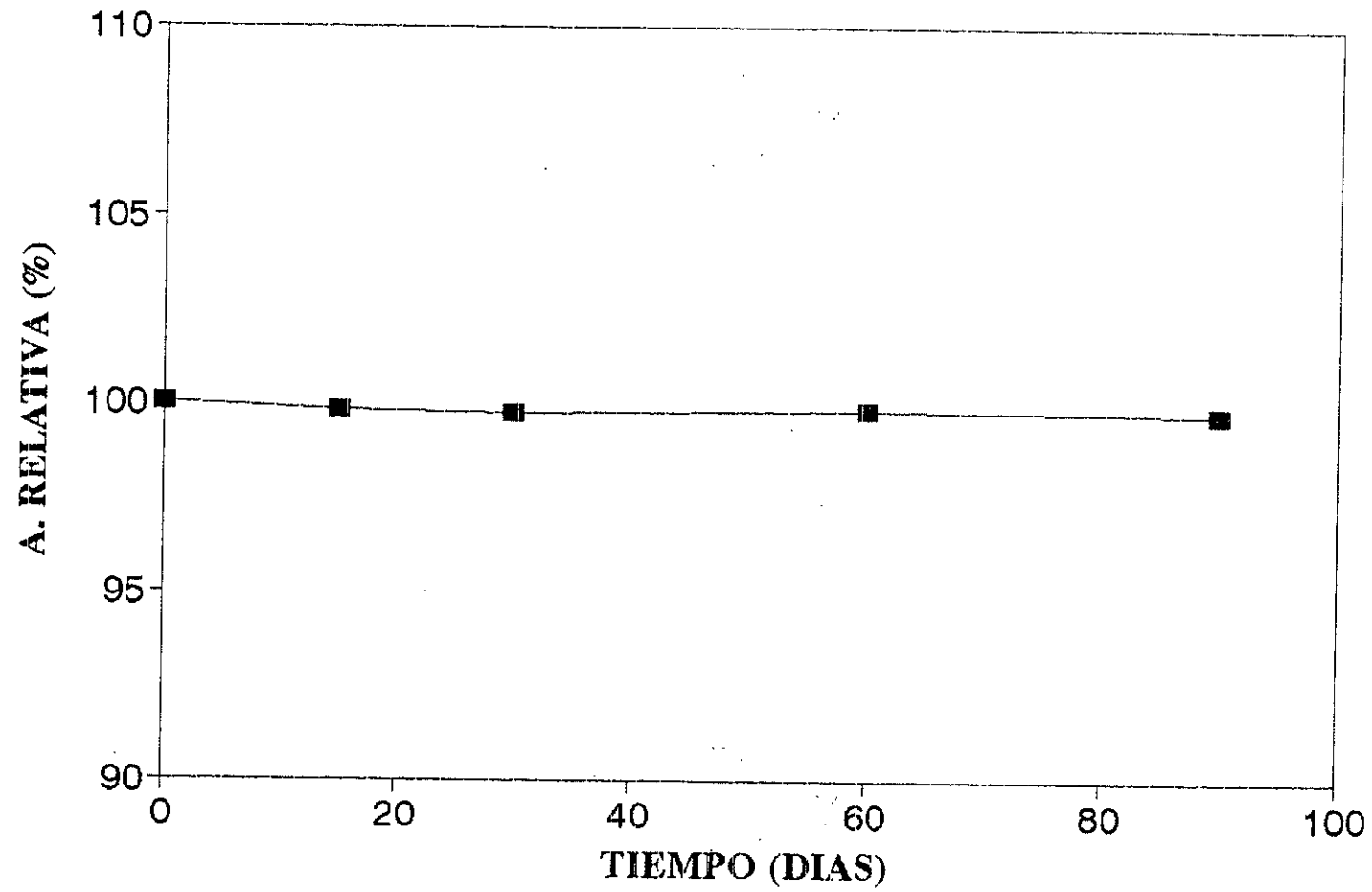
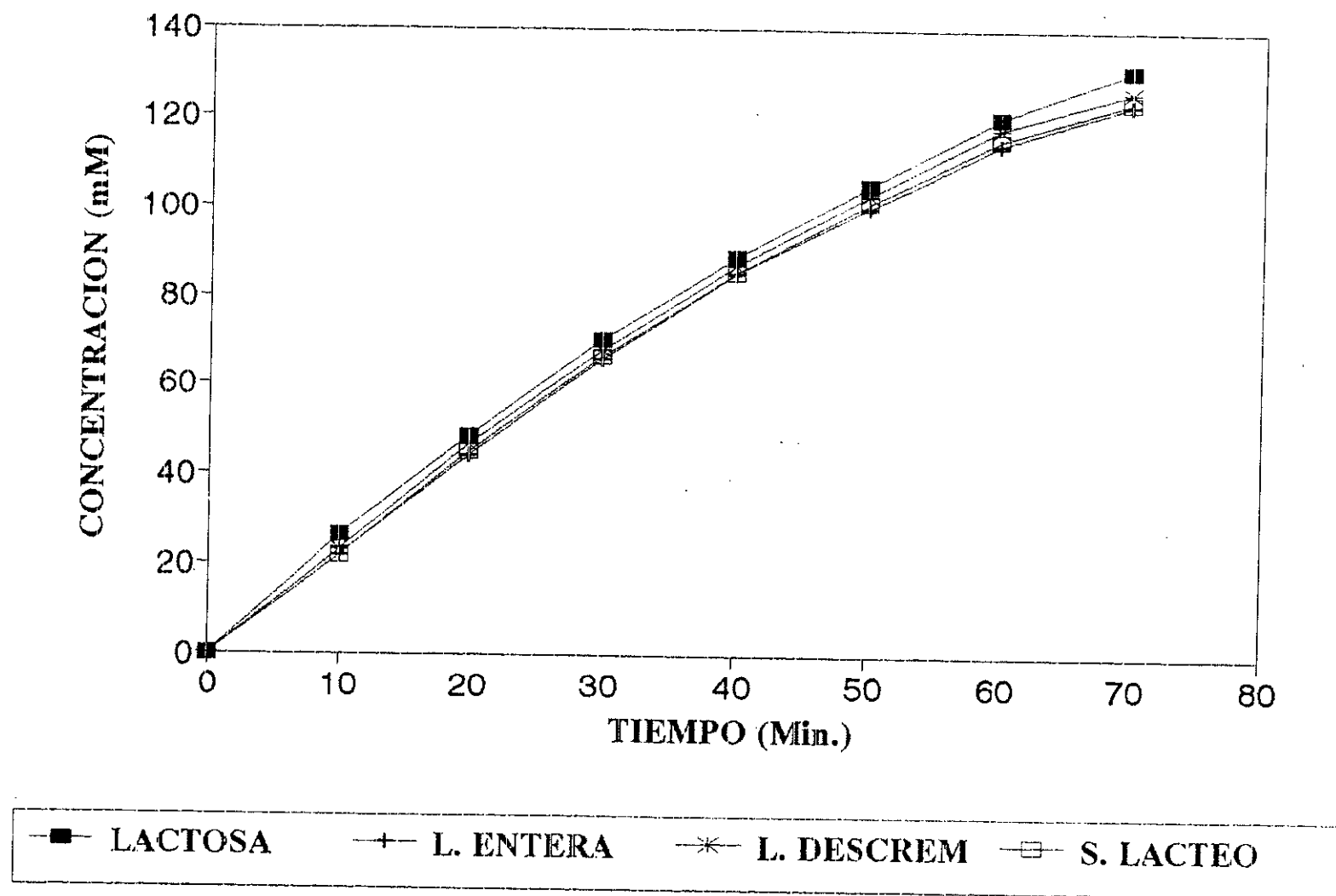
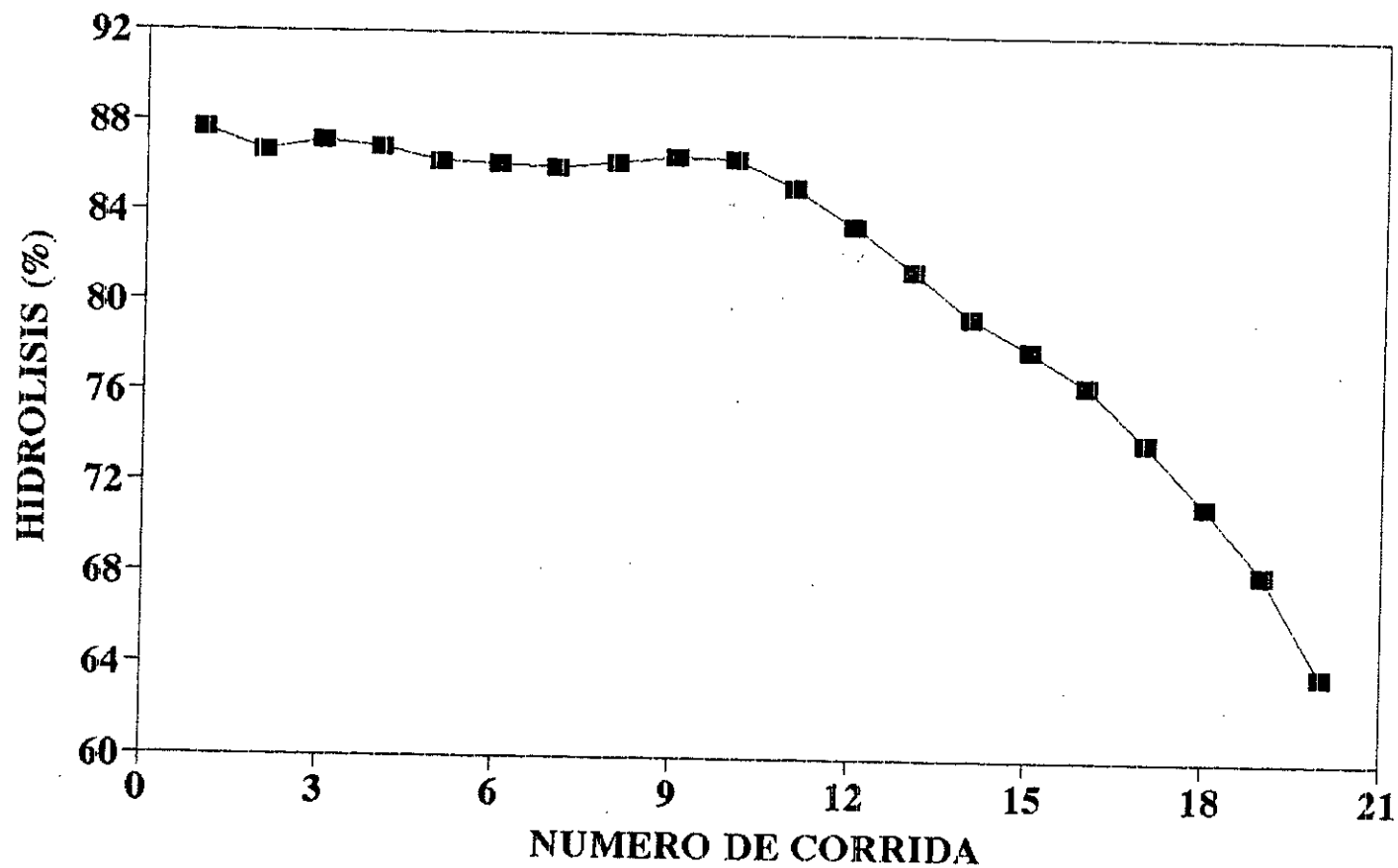


FIG. 17 HIDROLISIS DE LACTOSA



**FIG. 18 REUTILIZACION ENZIMA
INMOVILIZADA**



V.- DISCUSION

5.1.- Selección de las cepas de levaduras con potencial de producción de β -galactosidasa.

El análisis de varianza con una confiabilidad del 95% de la actividad específica y unidades de actividad por miligramo de peso seco celular realizados a las cepas de levaduras productoras de β -galactosidasa en lactosa y ONPG como sustratos muestran que la levadura *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109, maximiza la respuesta, en relación a la actividad específica y a las unidades por miligramo de peso seco celular. Siendo estos valores de 14.5 U/mg de proteína y de 3.5 Unidades de actividad/mg de peso seco celular para lactosa como sustrato y de 5.43 U/min/mg de proteína y de 1.30 Unidades de actividad/mg de peso seco celular para ONPG como sustrato. Estos valores son mayores a 8.39 U/mg de proteína y 3.29 U.A/mg de peso seco celular para lactosa como sustrato y 3.11 U/mg de proteína y 1.22 U.A/mg de peso seco celular para ONPG reportados por (Mahoney y Whitaker 1975)⁽⁵⁷⁾.

5.2.- Extracción de la enzima.

Los resultados de los análisis de varianza con una confiabilidad del 99% para las condiciones de extracción de la enzima de células viables, que maximizan la respuesta fueron: tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0, suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso, temperatura 30°C, concentración de tolueno 2% y 15 horas de extracción. En la presente investigación se mejoró el tiempo de extracción. Tiempos de 21 y 17 horas bajo condiciones similares han sido reportados para *Kluyveromyces fragilis* (sinónimo de *K. marxianus*) por (Mahoney y Whitaker 1975 y Fenton 1982)^(57, 28).

5.3.- Purificación de la enzima.

La purificación parcial de la enzima nos permitió obtener una enzima con una actividad específica de 72.9 Unidades/mg de proteína y un rendimiento de purificación del 93%. Valores de 97 y 89% de rendimiento de purificación con acetona son reportados por (Mahoney y Whitaker 1978, Greenberg y Mahoney 1981) ^(59, 38).

5.4.- Optimización y estandarización del medio de cultivo para la producción de β -galactosidasa.

El análisis estadístico del diseño factorial simplificado, en base a solo 15 experimentos para la optimización y estandarización del medio de cultivo para la producción de la enzima, tuvo como objetivo encontrar las variables que maximizan tanto la actividad específica, como las unidades de actividad por miligramo de peso seco celular. El modelo usado que permitió encontrar las variables (factores) que influyen significativamente en el diseño factorial simplificado con una confiabilidad del 95% fue el de paso a paso. (Cox y Snell 1974, Hocking 1976) ^(17, 47). Los factores obtenidos fueron: factor B ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), factor C (extracto de levadura) y factor D (K_2HPO_4) y la interacción de ellos.

El factor A (lactosa) no influye significativamente en el diseño factorial empleado. Con las concentraciones usadas en el diseño de 25, 50 y 75 g/l y la interacción con los factores B ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), C (extracto de levadura) y D (K_2HPO_4) maximizan las respuestas de actividad específica y de unidades de actividad por miligramo de peso seco celular para las variables significativas en el nivel 2 del diseño.

Los valores que permitieron obtener las mejores respuestas en este nivel corresponden a: lactosa 50.0 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7.5 g/l, extracto de levadura 5.0 g/l y K_2HPO_4 4.5 g/l. Con estos valores se obtuvieron 1,327 unidades de ONPG

por gramo de biomasa y una actividad específica de 5.45 U/mg de proteína. Casas (1992)⁽¹²⁾ reporta valores de 4,000 unidades de ONPG por gramo de biomasa en células permeabilizadas inmovilizadas cultivadas en medio conteniendo: 50 g/l de lactosa, 8.4 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7.5 g/l de extracto de levadura y 4.5 g/l de (K_2HPO_4) .

A un nivel de 75 g/l de lactosa no se obtuvo un mayor rendimiento de unidades de actividad de β -galactosidasa esto, podría ser debido a las características fermentativas de *Kluyveromyces marxianus* y a la interacción de los otros factores. Esta levadura tiene un efecto "crabtree" negativa, en la cual el etanol es producido bajo condiciones de oxígeno limitante. Los cultivos en matraces agitados se consideran limitados de oxígeno y por esta razón exhiben una larga fase de crecimiento restrictivo asociado con la producción de etanol. (Inchaurredo 1993, Michel 1987)^(52, 64).

Con un nivel de 25 g/l de lactosa se obtuvieron rendimientos menores de unidades de actividad de β -galactosidasa, esto podría deberse a que la concentración de lactosa presente en el medio y la interacción de los otros factores no permitieron una adecuada síntesis de la enzima (Dickson 1979)⁽²⁷⁾.

5.5. Determinación del rendimiento de inmovilización y actividad específica.

Los resultados del análisis de varianza con un nivel de confiabilidad del 95% para el rendimiento de inmovilización y actividad específica corresponden a aquellos obtenidos a la razón óptima glutaraldehído/quitina de 0.4 g al 25% obtenida en la etapa de activación y muestran el efecto de la enzima contactada/quitina en el rendimiento de inmovilización y la actividad específica del catalizador obtenido, estos valores alcanzan su punto de equilibrio entre los valores de 220 a 440 unidades por gramo de quitina.

La mayor carga proteica no incrementa al rendimiento, lo cual podría deberse a una sobresaturación de la enzima en el catalizador, y la actividad en éste no pueda expresarse adecuadamente (Illanés 1988)⁽⁴⁵⁾. Los valores hallados fueron de 178.59 U/g soporte de actividad específica y 40.6% de rendimiento. Este rendimiento es mayor al 15 y 36% para lactasa de *Kluyveromyces marxianus* y al 36% para lactasas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* reportados por (Illanés 1988, 1990a, 1990b, 1993, 1994a, Stanley 1975)^(45, 46, 47, 49, 50, 83).

5.6. Determinación de la velocidad inicial de la enzima soluble e inmovilizada.

Los resultados de la velocidad inicial de la enzima soluble e inmovilizada muestran en el caso de la enzima soluble que la dilución 1:2000 fue la mínima concentración de la enzima requerida para obtener lecturas de densidad óptica adecuadas en el tiempo de ensayo, en relación a las otras diluciones consideradas en la experimentación.

Para la enzima inmovilizada en un rango de valores comprendidos hasta una densidad óptica referencial de 0.5, es posible verificar la linealidad de 0.001 hasta 0.005 gramos de soporte para un tiempo de 2 minutos que corresponden al espectro de lectura más amplio, el mismo que va acortándose conforme se considera un tiempo mayor. De esta forma para 4 minutos las lecturas comprenden un intervalo de 0.001-0.0019 gramos de soporte y en 6 minutos se tiene un intervalo más pequeño aún de 0.001-0.0013.

Es decir la relación entre tiempo y gramos de soporte es inversa con respecto a valores fijos de densidad óptica, a mayor tiempo menor intervalo de soporte para un rango referencial de densidad óptica.

5.7.- Determinación de los parámetros físico-químicos de la enzima soluble e inmovilizada.

Los resultados de los análisis de perfil de temperatura de la enzima soluble e inmovilizada muestran, que la máxima actividad específica de 66.69 U/mg. proteína y 218.74 U/g de soporte se obtuvieron a 40°C para la enzima soluble y a 50°C para la enzima inmovilizada. Estos valores fueron tomados como el 100% de actividad relativa. Sin embargo en la práctica la enzima inmovilizada es muy inestable a 50°C y para un tiempo de reacción tan breve la inactividad térmica de la enzima es despreciable, por esta razón los estudios para la enzima inmovilizada se llevaron a cabo a 40°C, (Illanés 1993)⁽⁴⁹⁾.

Los resultados de los análisis de perfil de pH a la temperatura de 40°C muestran que la máxima actividad específica de 67.77 U/mg proteína y 177.48 U/g soporte para la enzima soluble e inmovilizada se obtuvieron a pH 6.6. Estos valores fueron tomados como el 100% de la actividad relativa. Los resultados de ambos parámetros son similares a los reportados para levaduras por (Mahoney y Whitaker 1977, Canales 1985, Illanés 1993 - 1994a)^(58, 9, 49, 50).

El análisis de los resultados de las pruebas de termoestabilidad de la enzima soluble e inmovilizada muestran, que la enzima inmovilizada es significativamente más termoestable que la enzima soluble. La enzima inmovilizada mantiene 93% de actividad relativa a 40°C, mientras la enzima soluble mantiene 88% de actividad relativa. A temperaturas superiores a 40°C la inactivación de la enzima desciende hasta valores de actividad relativa de 3.26% a 55°C para la enzima soluble y de 3.34% a 70°C para la enzima inmovilizada. La inmovilización mejora la estabilidad de la enzima, (Flores 1995)⁽³⁰⁾.

5.8.- Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima soluble e inmovilizada.

El comportamiento cinético de la enzima soluble e inmovilizada se determinó sobre lactosa como sustrato, a pH óptimo y 40°C, obteniéndose valores de K_m de 15.13 y 49.43 mM y V_m de 72.80 micromoles/min/mg de proteína y de 160.62 micromoles/min/g de soporte para la enzima soluble e inmovilizada respectivamente. Valores similares para β -galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus* son reportados por, (Woychick y Wondolowski 1972, Borglum y Sternberg 1972, Dickson 1979, Illanés 1993, 1994a y Cavaille 1995)^(94, 6, 26, 49, 50, 15).

Las constantes de inhibición (K_i) para galactosa fueron 14.65 y 43.82 mM para la enzima soluble e inmovilizada. El K_i de la enzima inmovilizada es tres veces el K_i de la enzima soluble lo que indica una menor afinidad por el inhibidor lo que mejora su aplicación en los procesos de hidrólisis de productos lácteos. Estos valores son similares a los reportados para levaduras por (Goncalves 1982, Illanés 1993, 1994a, Cavaille 1995)^(34, 49, 50, 15).

5.9.- Estabilidad de la enzima soluble e inmovilizada.

Los resultados de los análisis de la estabilidad de la enzima soluble e inmovilizada muestran para la enzima soluble una vida media de 56 minutos a 40°C, una hora de vida media es reportado por (Illanés 1994a)⁽⁵⁰⁾. La enzima inmovilizada muestra una vida media de 176 minutos a 40°C, para 30°C más de 7 horas y a 25°C la enzima mantiene una estabilidad de más de 122 horas. Valores similares fueron reportados por (Brady 1995, Cavaille 1995)^(7, 15).

En refrigeración (4°C) la estabilidad de la enzima se mantuvo por 90 días sin pérdida significativa de la actividad, ésta característica es importante para su almacenamiento y uso. Resultados similares de 15 días hasta 14 meses,

sin pérdida significativa de actividad han sido reportados por (Woychick y Wondolowski 1972, Dahlqvist 1977, Halling y Dunnill 1979, Sarto 1985, Manjón 1985, Champluvier 1989)^(94, 23, 40, 80, 62, 18).

El ditioeritritol mejora la estabilidad de la enzima soluble e inmovilizada (Banerjee 1981)⁽⁴⁾. Asimismo los cationes Mg^{2+} y Mn^{2+} mejoran la estabilidad de la enzima (Biermann y Glantz 1968, Mahoney y Whitaker 1977)^(5, 58).

5.10.- Capacidad hidrolítica de la enzima inmovilizada.

Los resultados de los análisis de la capacidad hidrolítica de la enzima en lactosa en solución (4.5%), leche entera y descremada y suero lácteo, muestran un 100% de hidrólisis de la lactosa en solución en un tiempo de 70 minutos; mientras que para el mismo tiempo en leche descremada se obtiene un 97% de hidrólisis, en suero lácteo un 95% y en leche entera se obtuvo un 94% de hidrólisis. La lactosa en solución es hidrolizada más rápidamente que la leche descremada, el suero lácteo y la leche entera debido a que la leche contiene sólidos (proteínas) y cationes (Ca^{2+} , Zn^{2+} y Na^{+}) que inhiben la reacción (Wendorff 1969, Olson 1973, Wierbicki 1973b, Okos 1974, Mahoney 1978, Bales 1979, Sánchez 1980b, Pivarnick 1982, Flores 1995)^(88, 73, 93, 72, 59, 3, 79, 75, 30).

5.11.- Reutilización de la enzima inmovilizada.

Los resultados de la reutilización de la enzima inmovilizada en leche, muestran una hidrólisis de lactosa por encima del 80% a lo largo de 13 ensayos y descendiendo hasta un 70% de hidrólisis hasta el ensayo N° 18. Una hidrólisis de 70 a 80% es considerado como eficiente a nivel industrial, (Flores 1995)⁽³⁰⁾. Resultados similares entre 8 y 82 ensayos han sido

reportados con un 80% de hidrólisis por (Hustad 1973a, Kaul 1984, Rao 1988 y Sungur 1994)^(43, 44, 55, 77, 84).

El tiempo de operación del catalizador y no el número de repeticiones es el factor crucial en la reutilización de la enzima inmovilizada (Halling y Dunill 1979)⁽⁴⁰⁾.

VI.- CONCLUSIONES

Realizada la presente investigación se reportan las siguientes conclusiones :

1. La cepa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y-1109 demostró ser la mejor productora de β -galactosidasa sobre medio químicamente formulado conteniendo 50 g/l.
2. Las óptimas condiciones establecidas para la extracción de la enzima incluyeron 2% de tolueno (v/v), 15 horas de tratamiento, a 30°C, en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0 ± 0.1 , suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0.1 mM de sulfato de manganeso.
3. El protocolo experimental, permitió obtener un rendimiento de inmovilización de 40.6%, con la cual se obtuvo una vida media de 176 minutos a 40°C, manteniendo 99% de su actividad por tres meses a 4°C, y reteniendo hasta el 63.8% de su actividad aún después de ser usada por 20 veces.
4. La enzima inmovilizada tuvo una capacidad de hidrólisis del 100% sobre lactosa (4.5%), 97% sobre leche descremada, 95% sobre suero lácteo y 94% sobre leche entera.

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- **ANTIER, P, MOULIN, G AND GALZY, P. 1990.** Influence of composition of the culture on the behaviour of *Kluyveromyces fragilis* in chemostat culture. *Process Biochem.* 25 : 9 -13.
- 2.- **BAER, R. J, AND LOEWENSTEIN, M. 1979.** Activity of β -D-galactosidase from *Saccharomyces lactis* at temperature below 0° C. *J. Dairy Sci.* 62 : 1041-1044.
- 3.- **BALES, S. De AND CASTILLO, F. 1979.** Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey *Appl. Env. Microbiol.* 37 : 1201 - 1205.
- 4.- **BANERJEE, M, CHAKRAVARTY, A. AND MAJUMDAR, S.K. 1984.** Characteristic of yeast β -galactosidase immobilized on calcium alginate gels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 27 - 274.
- 5.- **BIERMANN, L. AND GLANTZ, M.D. 1968.** Isolation and characterization of β -galactosidase from *Saccharomyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta* 167:373-377.
- 6.- **BORGLUM, G.B. AND STERNBERG, M.Z. 1971.** Properties of a fungal lactase. *J. Food Sci.* 37 : 619 - 623.
- 7.- **BRADY, D, MARCHANT, R. Mc HALE, L, AND Mc HALE, A.P. 1995.** Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose containing media. *Enz. Microbiol. Technol.* 17 : 696 - 699.
- 8.- **BUNTING, P.S, AND LAIDLER, K.J. 1972.** Kinetic studies on solid-supported β -galactosidase. *Biochem.* 11 : 4477 - 4483.
- 9.- **CANALES, A. 1995.** Inmovilización de células con actividad de β -galactosidasa para la hidrólisis de lactosa en leche. Tesis para optar el grado de Licenciado. Fac. de Química. UNAM. MEXICO :
- 10.- **CARRARA, C.R. AND RUBIOLO, A.C. 1994.** Immobilization of β -galactosidase on chitosan. *Biotechnol. Prog.* 10 : 220 - 224.
- 11.- **CARRARA, C.R. AND RUBIOLO, A.C. 1996.** Determination of kinetics parameters for free and immobilized β -galactosidase. *Process Biochem.* 31 : 243 - 248.

- 12.- **CASAS, L.T. 1992.** Contribución al desarrollo de un proceso para la obtención de un biocatalizador con actividad de β -galactosidasa que pueda ser aplicado en leche y suero dulce de leche. Tesis de Dr. en Biotecnología UNAM. MEXICO.
- 13.- **CASTILLO, F. AND SANCHEZ, S, de. 1978.** Studies on the growth of *Kluyveromyces fragilis* on whey for the production of yeast protein . Acta Científica Venezolana 29 : 113 - 118.
- 14.- **CASTILLO, F. AND SANCHEZ, S, de. AND GONCALVES, J.A. 1979.** Nitrogen supplementation of milk whey for the growth of *Kluyveromyces fragilis*. Acta Científica Venezolana 30 : 588 - 590.
- 15.- **CAVILLE, D. AND COMBES, D. 1995.** Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. Biotechnol. Appl. Biochem 22 : 55 - 64.
- 16.- **COUGHLIN, R.W. AND CHARLES, M. 1980.** Applications of lactase and immobilized lactase. In immobilized enzymes in food processing. Ed. W.H. Pitcher. CRC- Press Boca Raton pp : 154 - 173.
- 17.- **COX, D.R. AND SNELL, E.J. 1974.** The choice of variables in observational studies. Appl. Statist 23 : 51 - 59.
- 18.- **CHAMPLUVIER, B, KAMP, B, AND ROUXHET, P.G. 1988.** Preparation and properties of β -galactosidase confined in cells of *Kluyveromyces sp.* Enz. Microbiol. Technol. 10 : 611 - 616.
- 19.- **CHAN, H.M.C. 1971.** Factors influence the hydrolysis of the lactose by β -galactosidase isolate from *Saccharomyces fragilis*. M. Sci. Thesis University of California Davis.
- 20.- **CHEN, K-CH, HOUNG, J-Y, AND LING, A-C, 1985.** Product inhibition of the enzymatic hydrolysis of lactose. Enz. Microbiol. Technol. 7 : 510 -514.
- 21.- **CHEN, K-CH, HOUNG, J-Y, AND LEE, T-CH, 1992.** Search method for the optimal medium for the production of lactase by *Kluyveromyces fragilis*. Enz. Microbiol. Technol. 14 : 659 - 664.
- 22.- **DAHLQVIST, A, MATTIASSON, B, AND MOSBACH, K. 1973.** Hydrolysis of β -galactosidase using polymer entrapped lactase : A study towards producing lactose free milk. Biotechnol. Bioeng. 15 : 395 - 402.

- 23.- DAHLQVIST, A, ASP, N.G, BURVALL, A. AND RAUSING, H. 1977. Hydrolysis of lactose in milk and whey with minute amounts of lactase. J. Dairy Research 44 : 541- 548.
- 24.- DAVIES, A. 1956. Some factors affecting lactase formation and activity in *Saccharomyces fragilis* . J. Gen. Microbiol. 14 : 425 - 439.
- 25.- DAVIES, R. 1964. Lactose utilization and hydrolysis in *Saccharomyces fragilis* . J. Gen. Microbiol. 37 : 81 - 98.
- 26.- DICKSON , R.C, DICKSON, L.R, AND MARKINS, J.S. 1978. Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from yeast *Kluyveromyces lactis*. J. Bact. 137 : 51 - 61.
- 27.- DICKSON , R.C, AND MARKINS, J.S. 1980. Physiological studies of β -D-galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. J. Bact. 142 :777 - 785.
- 28.- FENTON, D.M. 1982. Solvent treatment for β -galactosidase release from yeast cells. Enz. Microbiol. Technol 4 : 229 - 239.
- 29.- FLORES, A. 1993. Aislamiento y selección de levaduras alimenticias. Informe. Técnico-científico. UNU/UNESCO.
- 30.- FLORES, M.V, VOGET, C.E, AND ERTOLA, R.J.J. 1995. Stabilization of a cell biocatalyst with β -galactosidase activity by glutaraldehyde treatment. J. Chem. Technol. Biotechnol. 64 : 353 -360.
- 31.- GARCIA-GARIBAY, M, TORRES, J, LOPEZ MUNGUIA-CANALES, A, AND CASAS, L.T. 1987. Influence of oxygen transfer rate on β -galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnol. Letters 9 : 417 - 420.
- 32.- GEKAS, V, AND LOPEZ LEIVA, M. 1985. Hydrolysis of a lactose : A literature review. Process Biochem. 2 : 2 - 12.
- 33.- GIACIN, J.R, JAKUBOWSKI, J, LEEDER, J.G, GILBERT, S.G, AND KLEYN, D.H. 1974. Characterization of lactase immobilized on collagen : Conversion of whey lactose by soluble and immobilized lactase. J. Food Sci. 39 : 751 - 754.
- 34.- GONCALVES, J.A, AND CASTILLO, F.J. 1982. Partial purification and characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. J. Dairy Sci. 65 : 2088 - 2094.

- 35.- **GONZALEZ, M, PEÑA, C, AND CASAS, L.T 1990.** Partial purification of β -galactosidase from yeast by an aqueous two-phase system method. *Process Biochem. Int.* Oct : 157 -161.
- 36.- **GONZALEZ SISO, M.I, FREIRE, A, RAMIL, E, BELMONTE, E.R, TORRES, A.R, AND CERDAN, E. 1994a.** Covalent immobilization of β -galactosidase on corn grits : A system for lactose hydrolysis without diffusional resistance. *Process Biochem.* 29 : 7 - 12.
- 37.- **GONZALEZ SISO, M.I. 1994b.** β -galactosidase production by *Kluyveromyces lactis* on milk whey : batch versus fed-batch cultures. *Process Biochem.* 29 : 565 - 568.
- 38.- **GREENBERG, N.A, AND MAHONEY, R.R. 1981.-** A rapid purification of β -galactosidase (*Aspergillus niger*) from a commercial preparation. *J. Food Sci.* 46 : 684 - 687.
- 39.- **GUY, E.J, AND BINGHAM, E.W. 1978.** Properties of β -galactosidase of *Saccharomyces lactis* in milk and milk products. *J. Dairy Sci.* 61 : 147 - 151.
- 40.- **HALLING, P.J, AND DUNNILL, P. 1979.** Hydrolysis of lactose in milk by lactase immobilized to a non-porous magnetic support. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8 : 27 - 36.
- 41.- **HOCKING, R.R. 1976.** The analysis and selection of variables in linear regression. *Biometrics* 32 : 1 - 49.
- 42.- **HOLSINGER, V.H. 1978.** Applications of lactose-modified milk and whey. *Food Technol.* 32 : 35 - 40.
- 43.- **HUSTAD, G.O, RICHARDSON, T, AND OLSON, N.F. 1973a.** Immobilized of β -galactosidase on an insoluble carrier with a polyisocyanate polymer : I. Preparation and properties. *J. Dairy Sci.* 56 : 1111 - 1117.
- 44.- **HUSTAD, G.O, RICHARDSON, T, AND OLSON, N.F. 1973b.** Immobilized of β -galactosidase on an insoluble carrier with a polyisocyanate polymer : II. Kinetics and stability. *J. Dairy Sci.* 56 : 1118 - 1122.
- 45.- **ILLANES, A, ZUÑIGA, M.E, CHAMY, R, AND MARCHESE, M.P. 1988.** Immobilization of lactase and invertase on cross linked chitin. In *Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells.* (De. Moo-YoungM) Edt. Elsevier Appl. Sci. London : 233 - 249.

- 46.- ILLANES, A, ZUÑIGA, M.E, Y RUIZ, A. 1990a. Inmovilización de lactasa microbiana. Arch. Biol. Exp. 23 : 159 - 164. Printed in Chile.
- 47.- ILLANES, A, RUIZ, A, ZUÑIGA, M.E, AGUIRRE, C, O'REILLY, S, AND CUROTTO, E. 1990b. Immobilization of lactase for the continuous hydrolysis of whey permeate. Bioprocess Eng. 5 : 257 - 262.
- 48.- ILLANES, A, CUROTTO, E, RUIZ, A, VAZQUEZ, T, ZUÑIGA, M.E, RUIZ, A, Y VAZQUEZ, M. 1991. Inmovilización de lactasa de *Kluyveromyces fragilis* en quitina y quitosano. Actas II Congreso Nacional de Biotecnología : Trabajo N°39. Viña del Mar.
- 49.- ILLANES, A, RUIZ, A, AND ZUÑIGA, M.E, AND. 1993. Análisis comparativo de dos lactasas microbianas inmovilizadas. Alimentos N° 1 : 26 - 34.
- 50.- ILLANES, A, CUROTTO, E, ZUÑIGA, M.E, RUIZ, A, AND VAZQUEZ, T. 1994a Immobilization of yeast lactase on chitin matrices. Taller Internacional sobre Utilización Industrial de levaduras. U. C. V. Valparaíso Octubre : 1 - 16.
- 51.- ILLANES, A. 1994b. Chitin as matrix for enzymes immobilization. E. Galindo and O.I Ramírez. Eds) : Advances in Bioprocess Engineering : 461 - 466. Kluwer Academic Publishers.
- 52.- INCHAURRONGO, V.A, YANTORNO, O.M, AND VOGET, C.E. 1994. Yeast growth and β -galactosidase and production during aerobic batch culture in lactose-limited syntetic medium. Process Biochem. 29 : 47 - 54.
- 53.- JASPERS, H.T.A, CHRISTIANSE, R, AND VAN STEVENINCK, J. 1975. An improved method for the preparation of yeast enzymes in situ. Biochem. Biophys Res. Commun. 65 : 1434 - 1439.
- 54.- JOSHI, M.S, GOWDA, L.R, KATWA, L.C, AND BHAT, S.G. 1989. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactase by digitonin. Enz. Microbiol. Technol. 11 : 439 - 443.
- 55.- KAUL, R, D'SOUZA, S.F, AND NADKARNI, G.B. 1984. Hydrolysis of milk lactose by immobilized β -galactosidase hen-egg white powder. Biotechnol. Bioeng. 26 : 901 - 904.
- 56.- LOWRY, O.H, ROSEBROUGH, H.J, FARR, A.L, AND RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265 - 275.

- 57.- MAHONEY, R.R, NICKERSON, A, AND WHITAKER, J.R. 1975. Selection of strains growth condition and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Dairy Sci. 58 : 1620 - 1629.
- 58.- MAHONEY, R.R, AND WHITAKER, J.R. 1977. Stability and enzymatic properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Food Biochem. 1 : 327 -351.
- 59.- MAHONEY, R.R, AND WHITAKER, J.R. 1978. Purification and physicochemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. J. Food Sci. 43 : 584 - 591.
- 60.- MAHONEY, R.R, AND ADAMCHUK, C. 1980. Effects of milk constituents on the hydrolysis of lactose from *Kluyveromyces fragilis*. J. Food Sci. 45 : 962 -968.
- 61.- MAIORELLA, B.L, AND CASTILLO, F.J. 1984. Ethanol. Biomass and enzyme production for whey waste abatement. Process Biochem. 19 : 157 - 161.
- 62.- MANJON, A, LLORCA, F.I, BONETE, M.J, BASTIDA, J, AND IBORRA, J.I. 1985. Properties of β -galactosidase covalently immobilized to glycophasse.coated porous glass. Process Biochem. 20 : 17 - 22.
- 63.- MAWSON, A.J. 1988. Yeast biomass production from acis whey permeate. Biotechnol. Letters 10 : 503 - 508.
- 64.- MICHEL, A, JACOB, F, PERRIER, J, AND PONCET, S. 1987. Yeast production from crude whey. Biotechnol. Bioeng. 20 : 780 -783.
- 65.- MILLER, G.L. 1959. Use of dinitrosalycilic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31 : 426 - 428.
- 66.- MORESI, M, NACCA, C, NARDI, R, AND PALLESCHI, C. 1979a. Factor analysis in a whey fermentation by *Kluyveromyces fragilis*. European J. Appl. Microbiol. Technol. 8 : 49 - 61.
- 67.- MORESI, M, AND SEBASTIANI, E. 1979b. Optimization of whey fermentation in a shaken-flask fermenter. European J. Appl. Microbiol, Technol. 8 : 63 - 71.
- 68.- MORESI, M, COLICCHIO, A, AND SANSOVINI, F. 1980a. Optimization of whey fermentation in a jar fermenter, European J. Appl. Microbiol, Technol. 9 : 173 - 183.

- 69.- MORESI, M, COLICCHIO, A, SANSOVINI, F, AND SEBASTIANI, E. 1980b Chemical oxygen demand reduction in a whey fermentation. European J. Appl. Microbiol, Technol. 9 : 261 - 274.
- 70.- MORESI, M, PATETE, M, AND TRUNFIO, A. 1989. Scaling-up of a batch whey fermentation by *Kluyveromyces fragilis*. Applied Microbiol. Biotechnol. 31 : 495 - 501.
- 71.- NICKERSON, T.A, VUJICIC, J.E, AND LIN, A.Y. 1976. Colorimetric stimulation of lactose and hydrolytic products. J. Dairy Sci. 59 : 386 - 390.
- 72.- OKOS, E.S, AND HARPER, W.J. 1974. Activity and stability of β -galactosidase immobilized on porous glass. J. Food Sci. 39. 88 - 93.
- 73.- OLSON, A.C, AND STANLEY, W.L. 1973. Lactase and other enzymes bound to a phenol-formaldehyde resin with glutaraldehyde. J. Agric. Food Chem. 21 : 441 - 445..
- 74.- PAIGE, D.M, LEONARDO, E, CORDANO, A, NAKASHIMA, J, ADRIAZEN, B, AND GRAHAM, G.G. 1972. Lactose intolerance in Peruvian children effect of age and early nutrition. Am. J. Nutr. 25 : 297 - 301.
- 75.- PIVARNIK, L.F, AND RAND, A.G. 1992. Assay conditions effect on β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. J. Food Sci. 57 : 1020 -1021..
- 76.- RAABO, E, AND TERKILDSEN, T.C. 1960. On the enzymatic determination of blood glucose. Scand. J. Clin. Invest. 12 : 402 - 407.
- 77.- RAO, B.Y.K, GODBOLE, S.S, AND D'SOUZA, S.F. 1988. Preparation of lactose free milk by fermentation using immobilized *Saccharomyces fragilis*. Biotechnol. Letters 10 : 427 -430.
- 78.- SANCHEZ, S de. AND CASTILLO, F.J. 1980a. Effect of pH on the growth from *Kluyveromyces fragilis* on deproteinized whey. Acta Científica Venezolana 31 : 24 -26.
- 79.- SANCHEZ, S de. Y CASTILLO, F.J. 1980b. Producción, extracción y caracterización parcial de β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* crecida en suero de leche. Acta Científica Venezolana 31 : 154 - 159.
- 80.- SARTO, V, MARZETTI, A, AND FOCHER, B. 1985. β -D-galactosidases immobilized on solubles matrices. : Kinetics and stability. Enz. Microbiol. Technol. 7 : 515 -520.

- 81.- **SFORTUNATO, T, AND CONNORS, W.M. 1958.** Conversion of lactose to glucose and galactose with a minimum production of oligosacharides. U.S. pat. 2.826.502.
- 82.- **SHARP, A.K, KAY, G,AND LILLY, M.D. 1969.** The kinetics of β -galactosidase attached ro a porouscellulose sheets. Biotechnol. Bioeng. 11 : 363 - 380.
- 83.- **STANLEY, W.L, WATTERS, G.G, CHAN, B, AND MERCER, J.M. 1975.** Lactase and other enzymes bound to chitin with glutaraldehyde. Biotechnol. Bioeng. 17 : 315 - 326.
- 84.- **SUNGUR,S, AND AKBULUT, U. 1994.** Immobilization of β -galactosidase onto gelatin by glutaraldehyde and chromium (III) acetate. J. Chem. Technol. Biotechnol. 59 : 303 - 306.
- 85.- **SURVE, S.S, AND MAHONEY, R.R. 1994.** Kinetic stabilization of *Kluyveromyces marxianus* β -galactosidase by histidine and other amino acids. Biotechnol. Appl. Biochem. 20 : 55 - 65.
- 86.- **VAN DAM, B, REVALLIER-WARFFEMUS, J. G, AND VAN DAM-SCHERMERHORN. L.C. 1950.** Preparation of lactase from *Saccharomyces fragilis*. Neth. Milk Dairy J. 4 : 96.
- 87.- **VLACH, D, AND PRENOSIL, J. E. 1984.** J. Mol. Catal. 26 : 173 - 185.
- 88.- **WENDORFF, W.L. 1969.** Studies on the β -galactosidase activity of *Saccharomyces fragilis* and effect of substrate preparation. Ph D. thesis University of Wisconsin.
- 89.- **WENDORFF, W. L, AMUNDSON, C.H, AND OLSON, N.F. 1970.** Nutrients requirements and growth conditions for production of lactase enzyme by *Saccharomyces fragilis*. J. Milk Food Technol. 33 : 451 - 455.
- 90.- **WENDORFF, W. L, AMUNDSON, C.H, AND OLSON, N.F. 1971a.** Use of yeast β -galactosidase in milk and milk products. J. Milk Food Technol. 34 : 294 - 299.
- 91.- **WENDORFF, W. L, AND AMUNDSON, C.H. 1971b.** Characterization of β -galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. J. Milk Food Technol. 34 : 300 - 306.
- 92.- **WIERZBICKI, L.E, AND KOSIKOWSKI, F.V. 1973a.** Lactase potential of various microorganisms grow in whey. J. Dairy Sci. 56 : 26 - 32.

- 93.- **WIERZBICKI, L.E, AND KOSIKOWSKI, F.V. 1973b.** Kinetics of lactose hydrolysis in acid whey by β -galactosidase from ***Aspergillus niger***. J. Dairy Sci. 56 : 1396 - 1399.
- 94.- **WOYCHIK, J.H, AND WONDOLOWSKI, M.V. 1972.** Covalent bounding of fungal β -galactosidase to glass. Biochim. Biophys Acta 289 : 347 - 351.

APENDICE

A.- DETERMINACION DE LA CURVA ESTANDAR DE O-NITROFENOL

1) REACTIVOS

O-nitrofenol (ONP)

Solución tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.6, suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0,1 mM de sulfato de manganeso.

Solución de Na_2SO_4 0.5 M .

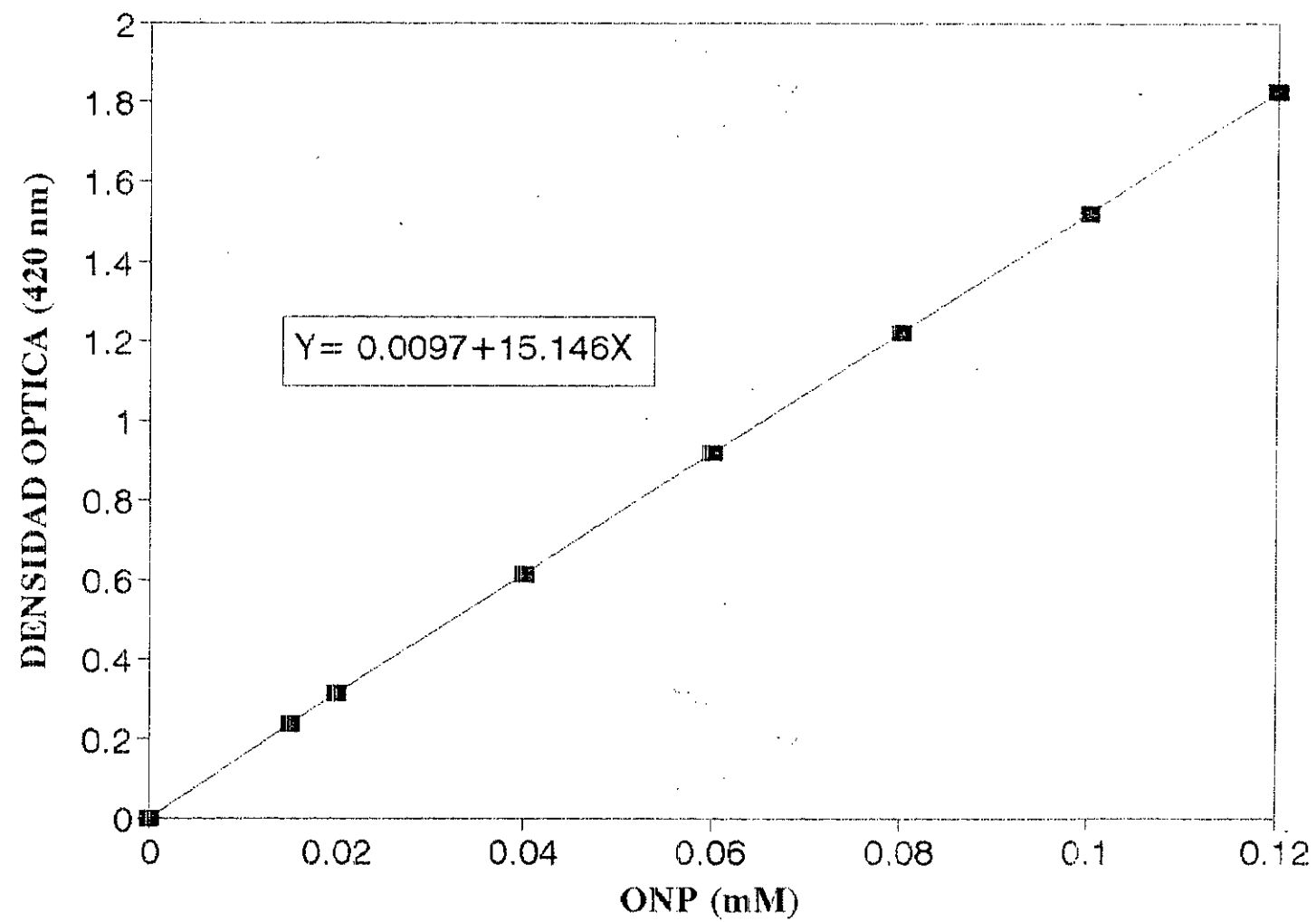
2) PROCEDIMIENTO

Preparar ONP entre 0.015 a 0.12 mM a partir de una solución 1 mM de ONP disuelto en tampón fosfato de potasio 0.1 M, pH, 6.6, suplementado con 1 mM de sulfato de magnesio y 0,1 mM de sulfato de manganeso.

Colocar a cada tubo 2 ml de cada concentración y 0.9 ml de la solución de carbonato de sodio. El blanco contiene 2 ml de tampón fosfato de potasio y 0.9 ml de carbonato de sodio.

Medir la absorbancia a 420 nm y graficar, densidad óptica versus concentraciones de ONP.

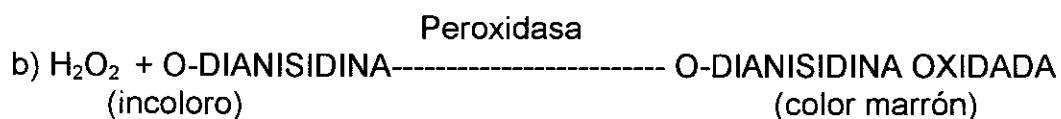
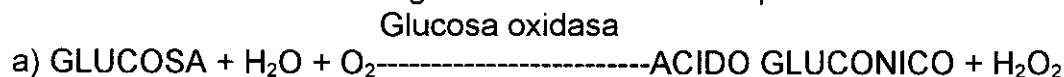
FIG. A - CURVA ESTANDAR DE ONP



B.- DETERMINACION DE GLUCOSA

(METODO DE RAABO Y TERKILDSSEN, 1960, MODIFICADO POR SIGMA)

El método se basa en las siguientes reacciones acopladas :



1) REACTIVOS

Solución de las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa.

Una cápsula de enzima PGO se disuelve en 100 ml de agua destilada en una botella ambar, agitar suavemente. La solución es estable por un mes a 4°C.

Reactivo coloreado de dihidrocloruro de O-dianisidina.

Se reconstituye un vial en 20 ml de agua destilada. Esta solución es estable por 3 meses a 4°C.

Solución combinada.

A los 100 ml de la solución de las enzimas agregar 1.6 ml del reactivo coloreado. Mezclar suavemente. Esta solución es estable a 4°C.

2) PROCEDIMIENTO

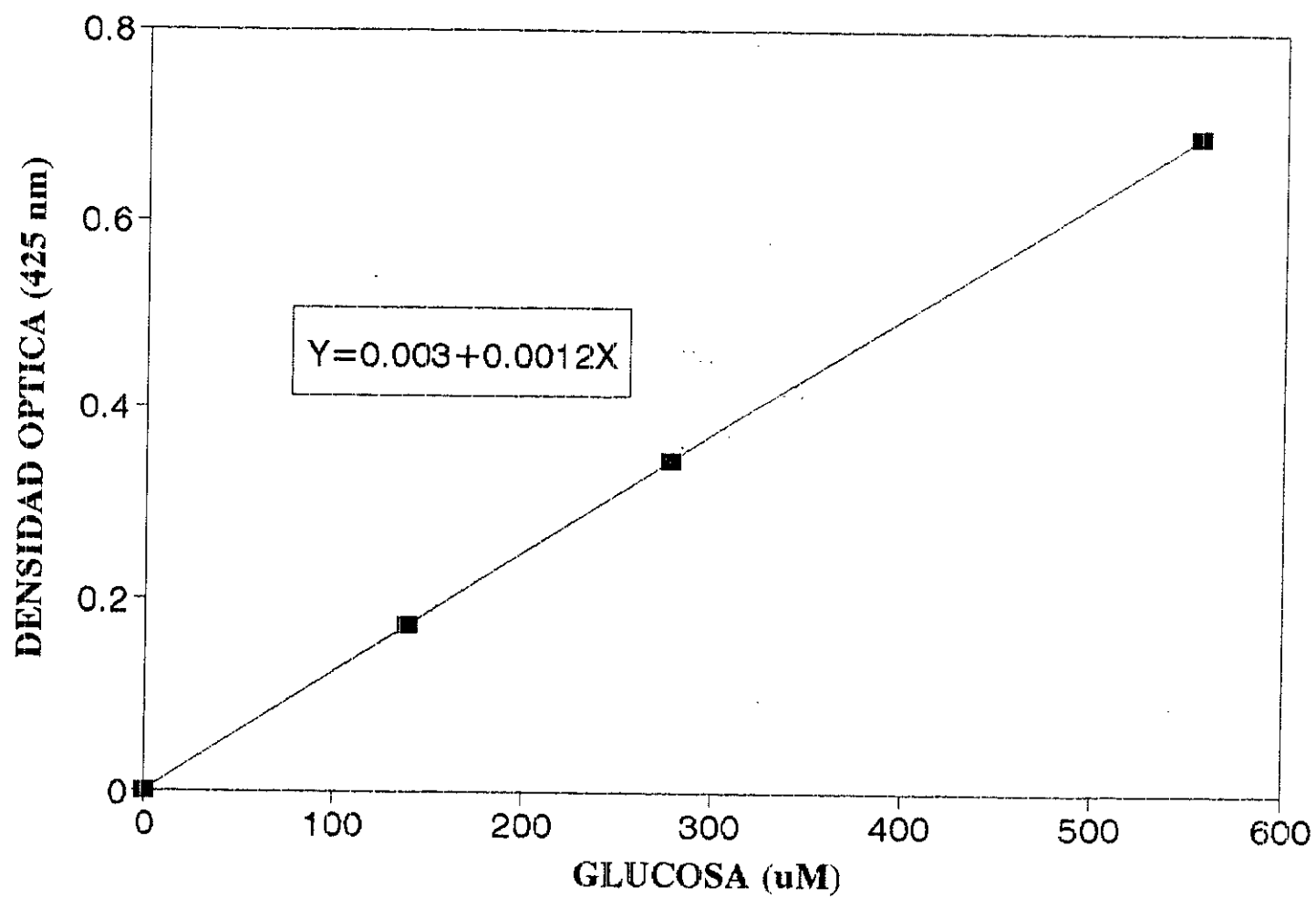
Preparar concentraciones de 0.05, 0.15 y 0.2 g/l a partir de una solución estandar de glucosa 1 g/l.

Agregar a cada tubo 0.5 ml de las concentraciones de glucosa. Al blanco 0.5 ml de agua destilada, igual procedimiento se sigue en el caso de las muestras problemas.

Añadir 2.5 ml de la solución combinada y mezclar.

Incubar a 37°C por 30 minutos. retirar los tubos de la incubadora, leer la absorbancia a 425 nm y graficar densidad óptica versus concentración de glucosa.

FIG. B CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA



**C.- DETERMINACION COLORIMETRICA DE LACTOSA
(METODO DE MILLER, 1959)**

1) REACTIVOS

Acido 3,5 dinitrosalicílico

Tartrato sódico-potásico

Hidróxido de sodio

2) PROCEDIMIENTO

Disolver 2.5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico y 75 g de tartrato sódico-potásico en 50 ml de NaOH 2 M y diluir a 250 ml.

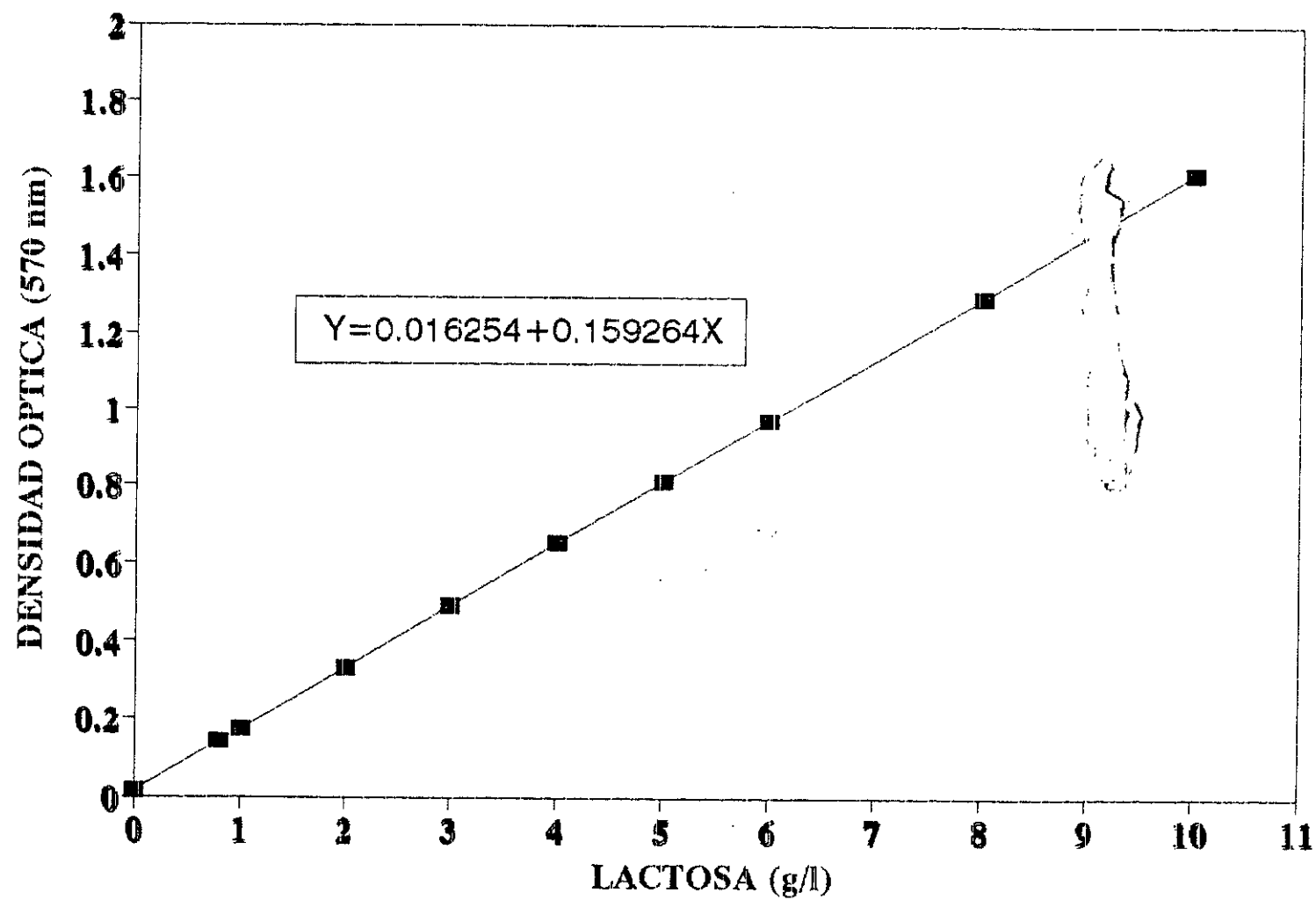
Preparar concentraciones de 0.8 a 10 g/l a partir de una solución 10 g/l de lactosa.

Colocar en cada tubo 1 ml de cada concentración de lactosa y 1 ml del reactivo. Igual procedimiento se sigue en el caso de las muestra problemas. Calentar la mezcla a 100 °C por 10 minutos.

Enfriar en un baño de hielo y adicionar 10 ml de agua destilada.

Medir la absorbancia a 570 nm y graficar densidad óptica versus concentración de lactosa.

FIG. C CURVA ESTANDAR DE LACTOSA



D.- DETERMINACION DE PROTEINAS

(METODO DE LOWRY, 1961 MODIFICADO)

1) REACTIVOS

Na_2CO_3 4%, CuSO_4 2% y tartrato sódico-potásico 4% mezclar (100:1:1) y filtrar en papel whatman N° 1.

Reactivo de fenol.

Esta solución corresponde al reactivo Folin de Ciocalteau diluido 1:6 con agua destilada.

2) PROCEDIMIENTO

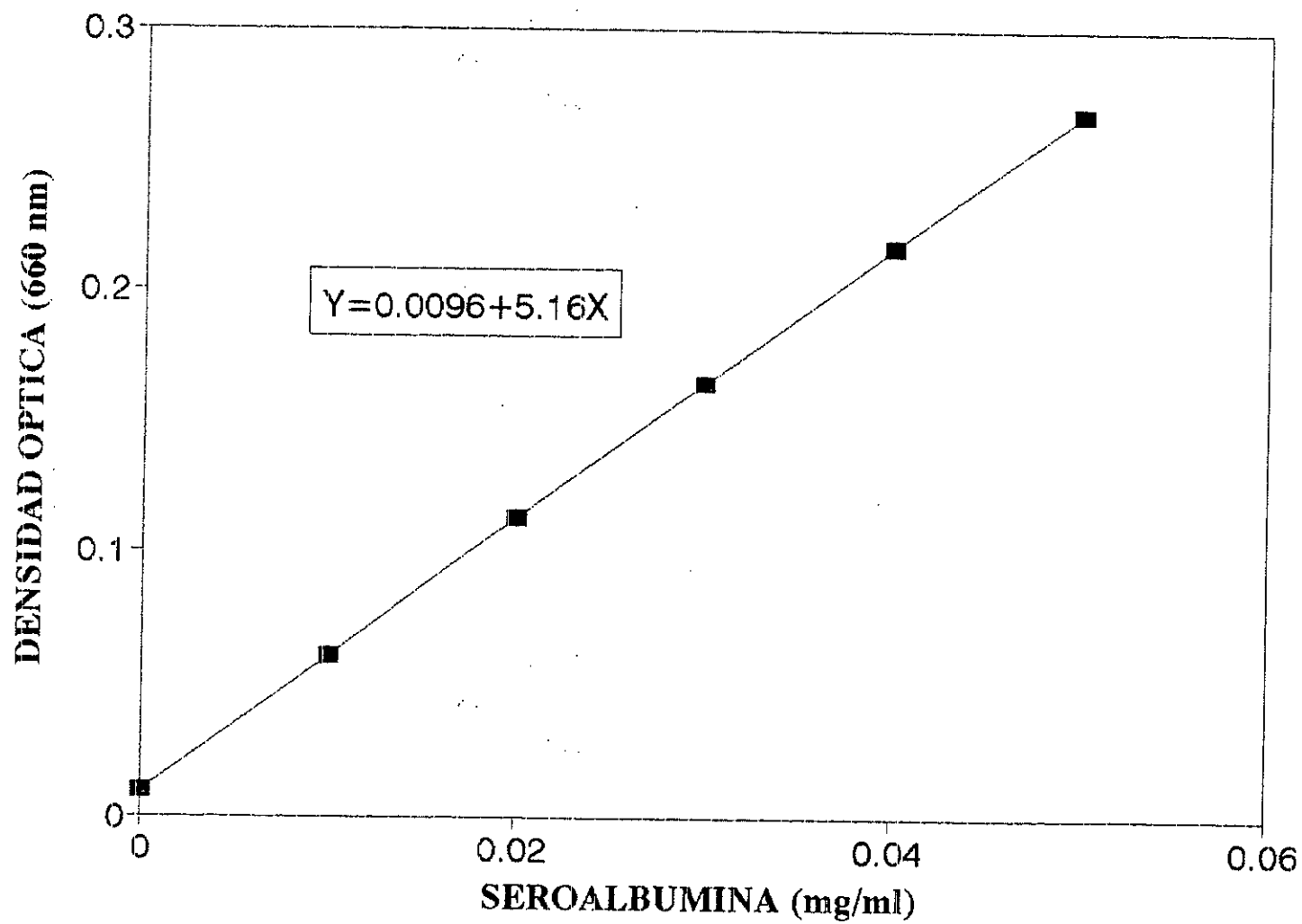
Colocar 0.1 a 0.5 ml de la solución estándar 0.1 mg/ml de seroalbúmina bovina. En el caso de las muestras problemas se tomó 0.1 ml de la dilución correspondiente.

Adicionar agua destilada hasta completar 0.5 ml. Al blanco 0.5 ml de agua destilada.

Adicionar 2 ml de la solución alcalina a cada tubo e incubar 15 minutos a 37°C.

Adicionar 0.5 ml de reactivo Folin-Ciocalteau e incubar 15 minutos a 37°C. Medir la absorbancia a 660 nm y graficar densidad óptica versus concentración de seroalbúmina bovina.

FIG. D - CURVA ESTANDAR DE PROTEINAS



E.- DISEÑO FACTORIAL SIMPLIFICADO EXPERIMENTAL

(MODELO PROPUESTO POR CHEN y COL. 1992)

Nº de Ensayo	Factores				Respuesta
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	Y ₁
2	2	1	1	1	Y ₂
3	1	2	2	2	Y ₃
4	2	2	1	1	Y ₄
5	1	1	2	2	Y ₅
6	2	2	2	1	Y ₆
7	1	1	1	2	Y ₇
8	2	2	2	2	Y ₈
9	3	2	2	2	Y ₉
10	2	3	3	3	Y ₁₀
11	3	3	2	2	Y ₁₁
12	2	2	3	3	Y ₁₂
13	3	3	3	2	Y ₁₃
14	2	2	2	3	Y ₁₄
15	3	3	3	3	Y ₁₅

F.- SOLUCIONES DE TAMPON FOSFATO DE POTASIO

pH 6.6

KH_2PO_4 8.5 g/l

K_2HPO_4 6.4 g/l

Agua destilada 1000 ml

pH 7.0

KH_2PO_4 5.3 g/l

K_2HPO_4 10.6 g/l

Agua destilada 1000 ml

pH 8.5

KH_2PO_4 0.041 g/l

K_2HPO_4 10.6 g/l

Agua destilada 1000 ml

Las soluciones tampón fosfato de potasio suplementadas contenían :

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.246 g/l

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.017 g/l